



HAL
open science

Étude de gènes candidats : Spata3 et Tex44 dans la spermatogenèse et Adam20 dans l'interaction gamétique

Marie-Sophie Girault

► **To cite this version:**

Marie-Sophie Girault. Étude de gènes candidats : Spata3 et Tex44 dans la spermatogenèse et Adam20 dans l'interaction gamétique. Reproduction sexuée. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5204 . tel-04826705

HAL Id: tel-04826705

<https://theses.hal.science/tel-04826705v1>

Submitted on 9 Dec 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Cité
École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (ED 562)

Laboratoire Institut Cochin (INSERM U1016/CNRS UMR8104)

Equipe : Des Gamètes à la Naissance

Etude de gènes candidats :
***Spata3* et *Tex44* dans la spermatogenèse et *Adam20* dans
l'interaction gamétique**

Par Marie-Sophie GIRAULT

Thèse de doctorat de Reproduction

Dirigée par Sandrine BARBAUX

Présentée et soutenue publiquement le 13 décembre 2023

Devant un jury composé de :

- Rapporteurs :
- **Charles COUTTON**, Professeur des Universités (PU-PH)
Université de Grenoble – Institut pour l'Avancée des Biosciences
 - **Pierre FOUCHET**, Directeur de Recherche (DR)
Université Paris - Saclay – CEA de Fontenay-aux-Roses
- Examinatrices :
- **Anaïs CARVALHO**, Chargée de Recherche (CR)
Université de Tours – INRAE Val de Loire
 - **Virginie ROUILLER-FABRE**, Professeur des Universités (PU-PH)
Université Paris Cité – CEA de Fontenay-aux-Roses
- Directrice de thèse :
- **Sandrine BARBAUX**, Chargée de Recherche (CR)
Université Paris Cité – Institut Cochin
- Membre invité :
- **Ahmed ZIYAT**, Maître de Conférences des Universités (MCU)
Université Paris Cité – Institut Cochin

Résumé

Etude de gènes candidats : *Spata3* et *Tex44* dans la spermatogenèse et *Adam20* dans l'interaction gamétique

La spermatogenèse est le processus biologique qui aboutit à la production de spermatozoïdes. Ceux-ci vont subir des étapes de maturation qui leur permettront de féconder l'ovocyte lors de l'interaction gamétique. Une anomalie lors de la spermatogenèse, de la maturation des spermatozoïdes ou de l'interaction gamétique peut mener à des défauts de fertilité. A ce jour, environ 15% des cas d'infertilité restent inexplicables. Il est donc essentiel de comprendre dans le détail les différents mécanismes de la spermatogenèse et de la fécondation.

L'objectif de ma thèse a été d'identifier des gènes pouvant jouer un rôle dans les étapes de la spermatogenèse et de l'interaction gamétique. J'ai tenté d'identifier des gènes impliqués dans la mise en place de l'acrosome (organite essentiel à la fécondation). En parallèle, je me suis intéressée à l'interaction gamétique, en caractérisant un gène potentiellement impliqué dans la fusion des gamètes.

Dans le premier volet de ma thèse, j'ai analysé des lignées hypofertiles de souris IRCS (Interspecific Recombinant Congenic Strain) qui présentaient un phénotype de globozoospermie partielle caractérisée par un détachement de l'acrosome. Nous avons pu définir un locus *Mafq1* pour Male fertility Quantitative Trait Locus chromosome 1, dans lequel l'expression de gènes de version *Mus spretus* dans un fond génétique *Mus musculus domesticus* induisait l'apparition de ce phénotype. Dans *Mafq1*, nous nous sommes intéressés au gène *Spermatogenesis Associated 3 (Spata3)* en générant une lignée de souris Knock-out (KO). Leur fertilité *in vivo* n'est pas affectée mais ils sont hypofertiles *in vitro*. Leurs spermatozoïdes présentent des défauts morphologiques (détachement partiel de l'acrosome) et métaboliques (persistance de résidus cytoplasmiques avec gouttelettes lipidiques). La lignée KO *Spata3* ne reproduit que partiellement le phénotype observé dans les lignées IRCS. Nous avons poursuivi en étudiant le gène *Tex44* présent dans *Mafq1*. Les mâles KO *Tex44* ont une fertilité diminuée *in vivo* et *in vitro*. Aucun défaut acrosomal n'a été observé mais une anomalie du flagelle a été identifiée : une disjonction entre la pièce principale et la pièce intermédiaire, ainsi que l'absence de certains doublets de microtubules de la pièce principale. Ces anomalies flagellaires affectent la mobilité des spermatozoïdes et expliquent l'hypofertilité observée.

Ainsi, en partant de l'analyse génomique d'une lignée IRCS présentant une globozoospermie partielle, nous avons identifié deux gènes impliqués dans la

spermatogenèse, l'un participant à la mise en place de l'acrosome, et l'autre impliqué dans la formation du flagelle.

Parallèlement, j'ai mené une étude visant à caractériser la fonction d'*ADAM20*, que nous suspicions de jouer un rôle dans l'adhésion et/ou la fusion gamétique. En réalisant des fécondations *in vitro* (FIV) chez l'humain en présence d'anticorps dirigés contre *ADAM20*, nous avons observé une diminution significative de l'index de fécondation suggérant un rôle dans l'interaction gamétique. Nous avons généré la lignée KO *Adam20* dont les mâles montrent une fertilité normale *in vivo* mais une hypofertilité *in vitro*. Nous avons généré des souris délétées pour un fragment contenant les gènes *Adam25*, *20* et *39* car ces trois gènes voisins sont très homologues. Les mâles triple KO ont présenté le même phénotype de fertilité que celui des mâles KO *Adam20*. *ADAM20* chez l'humain, et *ADAM25*, *20* et *39* chez la souris semblent donc jouer un rôle dans l'interaction gamétique mais ne sont pas essentiels au déroulement de cette étape.

Dans l'ensemble, ma thèse s'est donc intéressée à des anomalies de la fertilité dont l'origine pouvait se situer à différentes étapes de la spermatogenèse et de la fécondation. Même si des avancées sont réalisées dans la connaissance du processus de la fécondation, il subsiste encore des inconnues à ce jour, et il est crucial de continuer la recherche dans ce domaine afin de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de ces processus fondamentaux.

Mots clefs : Fertilité, Interaction Gamétique, Knock-Out (KO), Globozoospermie, Acrosome, Flagelle, *Mafq1*, *Spata3*, *Tex44*, *Adam20*, *Adam25*, *Adam39*

Abstract

Analysis of candidate genes : *Spata3* and *Tex44* in spermatogenesis and *Adam20* gamete interaction

Spermatogenesis is the biological process culminating in the production of spermatozoa. These latter undergo maturation steps that allow them to fertilize oocytes during gamete interaction. An anomaly happening during spermatogenesis, sperm maturation or gamete interaction can lead to fertility defects. Today, 15% of infertility cases remain unexplained. It is therefore essential to understand in detail the different mechanisms underlying spermatogenesis and gamete interaction.

The goal of my thesis was to identify new genes playing a role in the different stages of spermatogenesis and gamete interaction. I worked on the identification of genes responsible for the setup of the acrosome, an organelle essential for fertilization. In addition, I have studied gamete interaction by the analysis of a gene that could play a role in the fusion of gametes.

In the first part of my work, I analyzed mouse hypofertile IRCS (Interspecific Recombinant Congenic Strain) lines presenting a phenotype of partial globozoospermia characterized by an acrosome detachment. We could define a locus called *Mafq1* for Male fertility Quantitative Trait Locus on chromosome 1, in which the expression of some genes in a *Mus spretus* version within a global *Mus musculus domesticus* genomic background was responsible for the observed phenotype. Within *Mafq1*, we first studied the *Spermatogenesis Associated 3 (Spata3)* gene by producing a mouse Knock-Out (KO) line. KO males have a normal fertility *in vivo* but are hypofertile *in vitro*. Their sperm have morphologic (a partial acrosome detachment) as well as metabolic (remaining cytoplasmic residues including lipid droplets) defects. The *Spata3* KO line only partially reproduces the phenotype of the original IRCS. We then studied the *Tex44* gene located in the *Mafq1* region too. *Tex44* KO males have a reduced fertility both *in vivo* and *in vitro*. Acrosomes are normal but flagellar defects have been observed including a disjunction between the midpiece and the principal piece and the absence of some microtubule doublets in the principal piece. These flagellar anomalies can be responsible for the abnormal sperm motility and hypofertility. Therefore, the analysis of an IRCS line showing partial globozoospermia allowed us to identify two new genes involved in spermatogenesis, one participating to the acrosome setup, the other to flagellar structure.

In parallel, I conducted a project dedicated to the characterization of ADAM20's function, a protein suspected to play a role in adhesion and/or fusion of gametes. In *in vitro* fertilization assays in mice and humans, in the presence of antibodies directed against ADAM20, we observed a significant reduction of the fertilization index, suggesting a role of ADAM20 in gamete interaction. We generated an *Adam20* KO line in which KO males have a

normal *in vivo* fertility but a reduced *in vitro* fertility. We then generated a mouse line deleted for a genomic fragment encompassing the genes *Adam25*, *20* and *39* because these 3 neighbor genes are very homologous. The triple KO males have the same phenotype as *Adam20* KO males. ADAM20 in humans and ADAM25, 20 and 39 in mice seem to play a role in gamete interaction but are not essential for this step.

Globally, my thesis work concerned anomalies of fertility whose origins could be searched during spermatogenesis and gamete interaction stages. Though the knowledge on the fertilization process is regularly improving, some uncertainties still remain and it is crucial to pursue researches to completely decipher the mechanisms involved in these fundamental processes.

Keywords : Fertility, Gamete Interaction, Knock-Out (KO), Globozoospermia, Acrosome, Flagellum, *Mafq1*, *Spata3*, *Tex44*, *Adam20*, *Adam25*, *Adam39*

*A mon père, qui là où il est, continue de veiller sur moi.
A ma mère et aux autres membres de ma famille, à mes amis, à mes collègues, pour leur
soutien indéfectible.
Je témoignerai éternellement de la gratitude pour tout ce que vous avez fait pour moi.*

Remerciements

Je souhaite remercier dans un premier temps les membres du jury qui ont accepté d'étudier et d'évaluer mon travail : Charles Coutton, Pierre Fouchet, Anaïs Carvalho et Virginie Rouiller-Fabre.

Je souhaite adresser un immense merci à Sandrine qui m'a encadrée tout au long de ma thèse. Je te remercie pour ton soutien et ton accompagnement tout au long de ces 5 années passées à tes côtés, depuis mon M2 jusqu'à aujourd'hui. Merci pour tes qualités scientifiques qui m'ont permis d'apprendre beaucoup à tes côtés. J'en profite pour remercier les « galères » scientifiques qu'on a pu rencontrer ensemble au cours des différents projets. J'ai pu en tirer de l'expérience et certains réflexes à avoir pour ne pas répéter ces erreurs. Mais surtout merci pour la personne que tu es, pour ton humanité, ta gentillesse, ton écoute à tout instant, et ton soutien indéfectible. Ce n'est pas pour rien que tu es surnommée la Maman du Labo. Nous avons aussi été amenées à partager nos expériences personnelles où on a pu s'entraider : les demandes d'APA et les dossiers d'admission en Ehpad n'ont plus de secrets pour nous. Je te remercie également pour tous tes encouragements et ton aide précieuse au cours de la rédaction de cette thèse. Enfin, merci de m'avoir choisie comme doctorante, de m'avoir fait confiance, et d'avoir toujours cru en moi. Merci de ne m'avoir jamais lâchée malgré les difficultés que j'ai pu rencontrer, et merci de t'être battue pour deux sur le plan administratif pour que j'en arrive là aujourd'hui. Je n'aurais pas pu achever ma thèse sans ton soutien et ta bienveillance.

Je souhaite ensuite remercier Ahmed, qui même s'il ne l'est pas sur le papier, a agit envers moi comme un co-directeur de thèse. Je te remercie énormément pour ton écoute, ta disponibilité et ta bienveillance. Merci pour ta bonne humeur constante et ton sourire dès qu'on entre dans ton bureau. Je te remercie de m'avoir transmis ton savoir-faire au cours des FIV (ce n'est pas tous les jours un cadeau). Avec toi aussi j'ai pu partager une expérience personnelle, bien que nous aurions préféré tous les deux que l'autre n'ait pas à traverser cette épreuve. Je te remercie pour ton soutien tout au long de ces 5 années, merci d'avoir cru en moi et en mes capacités.

J'en viens alors à remercier l'ensemble des membres de l'équipe « Des gamètes à la naissance » pour m'avoir si bien accueillie et toujours soutenue durant ces 5 ans. Merci à Daniel, Julie, Céline, Patrick, Laurence et Côme pour votre bonne humeur et vos conseils. Plus généralement, merci à l'ensemble de l'équipe d'être celle qu'elle est : une équipe qui collabore, qui est toujours attentive et de bon conseil pour la préparation des présentations orales de chacun, et de très sympathiques moments passés ensemble notamment lors du déjeuner.

J'adresse un merci particulier au duo Patrick-Céline. Céline, je me souviendrai de nos discussions autour de l'actualité et de la politique et aussi du fait que tu essayes souvent de

mettre plusieurs fois le même chiffre dans les carrés des sudokus. Patrick, je te remercie pour ta bonne humeur, ton humour, ton rire communicatif et pour tes éternuements répétitifs qui nous font te reconnaître depuis l'autre bout du labo. Et enfin petite question pour vous deux : Qui a pris la gomme ?

Je tiens à remercier mon binôme, ma quasi homonyme, Sophie (D). Je suis ravie d'avoir partagé ces années avec toi. Ca a été un plaisir de travailler à tes côtés, de partager des expériences scientifiques, de l'entraide dont on a fait preuve lors des FIV de l'une ou l'autre. Merci d'avoir toujours été présente pour moi. Merci pour nos fous rires et nos sorties. Enfin, merci d'être celle que tu es ! Merci de rire à mes blagues pas toujours drôles, et à mes coups de folie le vendredi soir quand je galope dans le couloir du labo. Bref, merci Madame !

En continuant sur la lancée des Sophie's, je tiens à remercier Sophie (F) pour son écoute, son soutien et l'ensemble de ses conseils. Merci pour les moments et discussions qu'on a partagés ensemble. Merci d'être tête en l'air pour que je puisse te taquiner. Je te souhaite le meilleur dans ta future vie professionnelle, j'espère que tu y trouveras l'épanouissement que tu mérites. A très vite lors d'un concert de Suzane, ou autour d'un verre avec des amis communs (spéciale dédicace au Dr. François Robert).

Je souhaite également remercier Marine Foritano pour sa présence à mes côtés depuis toutes ces années. Nous nous sommes connues durant notre stage de M2, et même si tu as fait un détour par l'INRAE, tu es revenue au laboratoire depuis, pour mon plus grand plaisir. Merci de répondre toujours présente à mes sollicitations. Merci pour tes précieux conseils pour élever les lapins (dédicace à Paprika, Mimi, Fluffy et Lucky). Merci d'être aussi précise dans tes récits et autant premier degré pour que je puisse t'embêter. Enfin, merci pour ton soutien parfois douteux (ceci est une blague Marine).

Je tiens à remercier mes compères de pauses clopes : Audrey L'Hostis et Caroline Eozenou. Je vous remercie pour tous les bons moments passés ensemble, qui permettent de s'aérer l'esprit à défaut de s'oxygéner les poumons. Je vous remercie pour votre écoute sincère, vos conseils et vos encouragements lorsque j'en ai besoin. Merci à toutes les deux pour votre « drôlitude » (tu m'as inspirée Caroline). Audrey, je suis ravie de l'entrée de bébé Lucas dans ta vie, je souhaite le meilleur à ta petite famille.

Je souhaite remercier Clara A, Camino, Clara G, Emma, Mélina, Léa, Manon, Mitra et Alberto. Je suis ravie d'avoir partagé de nombreux moments avec vous, que ce soit au labo ou en dehors. Je vous remercie pour votre soutien et votre présence tout au long de ma thèse.

Enfin, je remercie également la nouvelle génération de stagiaires/doctorants qui vient renouveler le stock des jeunes. Merci à Lorenzo, Ikram, Nastia et Emma pour les moments partagés ensemble. Je vous envie d'avoir la chance d'être dans cette super équipe pendant encore quelques temps. Ikram et Emma, je vous souhaite le meilleur pour le déroulement de votre thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement ma famille d'avoir toujours été là pour moi et sans qui je ne serais celle que je suis aujourd'hui.

A ma grand-mère, Mamie du Perreux, bravo pour tes 100 ans, merci d'être celle que tu es et de l'amour que tu me portes.

A mes parents, merci pour tout ! Je vous remercie pour tout l'amour que vous m'avez porté, pour l'éducation que vous m'avez donnée et enfin de m'avoir soutenue tout au long de mes études (qui ont été longues). Merci d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Papa, ton absence me pèse tous les jours, j'aurais tant aimé voir dans ton regard la fierté de ma réussite en thèse, mais je ne doute pas que de là où tu es, tu portes sur moi ce sentiment de fierté. Maman, merci d'être toujours présente pour moi, et notamment cette dernière année. Je te remercie également de la relation privilégiée qu'on entretient ensemble et qui m'apporte un immense réconfort et soutien.

A mes oncles, Jean-Luc et Gérard, merci pour vos encouragements et votre soutien tout au long de ces années de thèse.

A mes grands frères, Olivier, Matthieu, Pierre et François-Xavier, merci pour votre présence à mes côtés et votre soutien.

A mes belles-sœurs, Virginie, Stéphanie et Laura, merci pour votre présence à mes côtés et pour vos encouragements. Merci de me considérer comme votre petite sœur. A Marie, tu aurais été ravie d'assister à ma soutenance et de pouvoir fêter cette réussite avec moi. Tout comme Papa, je ne doute pas que tu suivras cela de là où tu es.

A mes neveux, Gaspard, Lucie, Morgane, Anna et Victor, merci d'égayer ma vie. J'aime le rôle de tante que je joue auprès de vous, j'espère en être à la hauteur.

Enfin, je tiens à remercier mes amis qui m'ont toujours soutenue et avec qui je partage des moments précieux d'amitié.

Merci au groupe Master Aventure, Ophélie, Nolan, Mathilde, Nilak et Michaël pour leur soutien et leur présence depuis plusieurs années maintenant.

Merci à Jovan de partager les bons et les mauvais moments ensemble. L'année 2023 aura été une réussite pour tous les deux : moi sur le plan professionnel avec la réalisation de ma thèse, toi sur le plan personnel avec ton mariage et un futur bébé qui va bientôt arriver.

Merci à Marine pour ton soutien indéfectible et ta présence à mes côtés depuis le lycée. Merci d'avoir toujours cru en moi. L'amitié que nous partageons est précieuse. Je te remercie d'avoir fait de moi la témoin de ton mariage, j'en suis très fière. Et merci pour la joie que tu m'offres lorsque ton fils Timothée court vers moi avec son grand sourire en m'appelant « FIFI ».

Sommaire

RESUME	3
ABSTRACT	5
REMERCIEMENTS	9
SOMMAIRE	13
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION GENERALE.....	17
PARTIE 1 : LA REPRODUCTION COTE MASCULIN : DE LA SPERMATOGENESE A LA FECONDATION.....	20
I. DE LA FORMATION D’UN SPERMATOZOÏDE A LA FECONDATION	20
I.1. Le spermatozoïde	20
I.2. La spermatogenèse.....	21
I.2.a. La prolifération mitotique	22
I.2.b. La spermatocytogenèse	23
I.2.c. La spermiogenèse	24
I.2.c.1. La mise en place de l’acrosome	25
I.2.c.2. L’assemblage du flagelle	28
I.2.d. La maturation post-testiculaire	32
I.2.d.1. La maturation épидидymaire	32
I.2.d.2. La capacitation	33
I.2.d.3. La réaction acrosomique.....	34
II. L’INTERACTION GAMETIQUE	36
II.1. CD9 : organisateur moléculaire	38
II.2. IZUMO1 – JUNO : un couple ligand - récepteur	40
II.3. Les autres acteurs essentiels à l’interaction gamétique	42
II.4. Une protéine de fusion ?	43
II.5. La famille des ADAMs, protéines de l’interaction gamétique ?	45
III. LES DEFAUTS DE FERTILITE : ORIGINES POSSIBLES ET CONSEQUENCES	48
III.1. Anomalie de l’acrosome : La globozoospermie	48
III.2. Anomalies du flagelle : Anomalies Morphologiques Multiples du Flagelle.....	50
III.3. Anomalies de l’interaction gamétique	53
PARTIE 2 : DE L’ETUDE PHENOTYPIQUE A L’IDENTIFICATION DE GENES IMPLIQUES DANS LA SPERMATOGENESE.....	54
I. CONTEXTE DE L’ETUDE MENEES : L’ETABLISSEMENT DES LIGNEES DE SOURIS IRCS	54
II. SPATA3	56
III. TEX44	58
IV. ARTICLE N°1.....	61

V. ARTICLE N°2.....	77
VI. ARTICLE N°3.....	91
VII. DISCUSSION.....	104
PARTIE 3 : RECHERCHE D'UNE PROTEINE IMPLIQUEE DANS L'INTERACTION GAMETIQUE A PARTIR DE L'ETUDE DU CAS D'UN PATIENT INFERTILE	108
I. CONTEXTE DE L'ETUDE : CAS D'UN PATIENT INFERTILE.....	108
II. <i>ADAM20, ADAM25, ADAM39</i>	109
III. ARTICLE N°4.....	113
IV. ARTICLE N°5.....	121
V. DISCUSSION.....	134
CONCLUSION GENERALE	138
BIBLIOGRAPHIE	140

Liste des abréviations

ADAM : A Disintegrin And Metalloprotease

AMP : Aide Médicale à la Procréation

B6 : Lignée *Mus musculus domesticus* C57BL6/J

CASA : Computer-Aided Sperm Analysis (Analyse de sperme assistée par ordinateur)

DCST1&2 : DendroCyte expressed Seven Transmembrane Protein Domain-Containing 1 et 2

FIMP : Fertilization Influencing Membrane Protein

FIV : Fécondation *In Vitro*

GPI-AP : GlycosylPhosphatidyInositol Anchored - Protein (protéine liée à un complexe GPI)

ICSI : Intra-Cytoplasmic Sperm Injection

IRCS : Interspecific Recombinant Congenic Strain (lignée de souris recombinantes congéniques interspécifiques)

KO : Knock-Out

MMAF : Multiple morphological abnormalities of the sperm flagella

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PDI : Protéines Disulfide Isomérasés

QTL : Quantitative Trait Locus

SEG : Lignée *Mus spretus* SEG/Pas

SEPT4 : Septine 4

SNP : Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme d'un seul nucléotide)

SOF1 : Sperm-Oocyte Fusion required 1

SPACA6 : SPERM ACrosome Associated 6

TMEM95 : TransMEMbrane Protein 95

WT : Wild Type

Introduction Générale

La reproduction est un processus biologique, commun à tous les êtres vivants, qui permet la pérennité d'une espèce. En effet, elle assure le renouvellement d'une population en générant de nouveaux individus à partir d'individus préexistants. Chez les mammifères, la reproduction est dite sexuée. La reproduction sexuée chez les Mammifères se compose de différentes étapes : la fécondation, la nidation, la gestation et enfin l'accouchement. La fécondation consiste en la fusion de deux gamètes, l'un mâle et l'autre femelle, afin de former une cellule œuf (ou zygote). Le gamète mâle est appelé spermatozoïde, et le gamète femelle ovocyte. La rencontre de ces deux cellules haploïdes, puis leur reconnaissance et adhérence et enfin leur fusion permet de former une cellule œuf diploïde. En effet, la fusion de ces deux cellules haploïdes permet de réunir l'information génétique portée par les chromosomes de chacun des gamètes. Ainsi, le zygote formé présente un génome unique, dont 50 % proviennent du gamète femelle et les 50 % restant du gamète mâle. De cette façon, la reproduction sexuée assure une diversité et un brassage génétique. En amont de la fécondation, les gamètes doivent d'une part être formés correctement, et d'autre part passer par des étapes de maturation, afin que l'interaction gamétique se produise de façon optimale et ainsi former un zygote viable. Ainsi, une anomalie lors de la formation (gamétogenèse) et/ou de la maturation des gamètes aboutira à un défaut dans le processus de fécondation et conduira à des problèmes de fertilité. En effet, la conséquence d'une telle altération peut aller d'une fécondation moins efficace (hypofertilité) jusqu'à un échec de celle-ci (infertilité). Lorsque la reproduction est un échec, par défaut dans l'une ou l'autre de ces composantes, on parle d'infertilité.

Chez l'Homme, l'infertilité d'un couple hétérosexuel est définie par l'absence de grossesse obtenue après au moins 12 mois de rapports sexuels réguliers, sans contraception. Selon l'INSERM¹, les causes de l'infertilité du couple peuvent être de trois types : un problème affectant le système reproducteur féminin, un problème affectant le système reproducteur masculin, ou un problème mixte affectant les deux individus. Néanmoins, 10 à 25% des cas d'infertilité restent inexplicables (infertilité idiopathique). Les causes de l'infertilité peuvent donc être diverses, affecter l'un ou les deux membres du couple, et être dues à un défaut dans l'une ou l'autre des différentes étapes de la reproduction. A ce jour, nous savons également que les facteurs environnementaux, et notamment les perturbateurs endocriniens, peuvent grandement affecter la fertilité des couples en altérant la production et la qualité des gamètes. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), dans un communiqué de presse datant d'avril 2023, l'infertilité concernerait environ 17,5 % de la population mondiale, soit 1 personne sur 6². Le taux d'infertilité serait comparable dans tous les pays du monde, marquant ainsi un problème de santé publique au niveau mondial. En France, le ministère des Solidarités

¹ <https://www.inserm.fr/dossier/infertilite/>

² <https://www.who.int/fr/news/item/04-04-2023-1-in-6-people-globally-affected-by-infertility>

et de la Santé a indiqué dans son rapport de 2022 que l'infertilité toucherait 3,3 millions de personnes en France³. Ces chiffres sont en constante augmentation ces dernières années.

Pour répondre à cet enjeu de santé publique, il est donc essentiel de connaître et comprendre dans le détail les différents mécanismes intervenant au cours de la gamétogenèse et de la fécondation. En effet, même si des avancées sont réalisées dans la connaissance du fonctionnement de la fécondation, il subsiste encore des inconnues à ce jour, et il est crucial de continuer la recherche dans ce domaine afin d'élucider les mécanismes de la fécondation. Ainsi, cela permettrait de pouvoir identifier et si possible résoudre les problèmes d'infertilité, enjeu important dans la prise en charge des couples en Aide Médicale à la Procréation (AMP). En effet, cela pourrait permettre d'apporter un accompagnement plus ciblé au couple dans le cadre de l'AMP. Par ailleurs, une meilleure connaissance de la fécondation et des protéines impliquées aiderait à l'identification de nouvelles cibles potentielles de la contraception humaine.

Mon travail de thèse s'est intéressé plus particulièrement au gamète mâle, le spermatozoïde. J'ai notamment pu étudier une altération survenant au cours de la spermatogenèse, formation du spermatozoïde, ayant une incidence sur la capacité fécondante de ce dernier. Ma thèse s'est également portée sur l'étude d'ADAM20, protéine spermatique, et notamment sur le rôle qu'elle pourrait jouer au cours de l'interaction gamétique.

Ce manuscrit s'articulera en trois parties :

- La première partie sera une introduction à mes travaux de thèse, nécessaire pour la compréhension de la suite du manuscrit. Dans un premier chapitre, je présenterai le spermatozoïde, de sa formation jusqu'à la fécondation. Le second chapitre sera consacré à l'étape de l'interaction gamétique, phase clef de la fécondation. Dans cette partie, je décrirai le déroulement de cette étape et les différentes protéines connues à ce jour qui sont impliquées dans ce processus. Tout au long de ces deux chapitres, j'aborderai dans un ordre chronologique les différentes étapes de la reproduction chez les mammifères : de la spermatogenèse jusqu'à l'interaction gamétique. Enfin, dans un dernier chapitre, je développerai des types d'infertilité rares dues à des dysfonctionnements de structures spécifiques du spermatozoïde. Ainsi, dans un premier temps, je m'intéresserai aux anomalies de l'acrosome avec la globozoospermie. Dans un second temps, je m'intéresserai aux anomalies du flagelle avec les anomalies morphologiques multiples du flagelle. Enfin, j'aborderai les anomalies de l'interaction gamétique.

- La seconde partie de ma thèse portera sur la recherche d'une protéine jouant un rôle au cours de la spermatogenèse et plus particulièrement au cours de la formation de l'acrosome. Un défaut lors de la mise en place de l'acrosome est à l'origine d'une tératozoospermie (anomalie morphologique du spermatozoïde) appelée globozoospermie, entraînant une

³ https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_sur_les_causes_d_infertilite.pdf

hypofertilité voire une infertilité. Je présenterai mes travaux portant sur l'étude d'un modèle de globozoospermie par une approche d'inactivation de gène candidat.

- Enfin, la troisième et dernière partie de mon manuscrit s'intéressera à l'interaction gamétique. En se basant sur des données de la littérature et en particulier un article traitant du cas d'un patient infertile, nous nous sommes intéressés à la protéine ADAM20. Nous avons cherché à déterminer le rôle qu'elle pourrait jouer au cours de l'interaction gamétique.

Partie 1 : La reproduction côté masculin : de la spermatogenèse à la fécondation

I. De la formation d'un spermatozoïde à la fécondation

I.1. Le spermatozoïde

Le gamète mâle est le spermatozoïde. Il est produit dans le testicule au sein des tubes séminifères à partir de la puberté puis tout au long de la vie de l'individu. La formation des spermatozoïdes est appelée spermatogenèse. A la fin de la spermatogenèse, le spermatozoïde est immobile et immature. Il devra donc subir une maturation post-testiculaire, tout d'abord lors de son passage dans l'épididyme, puis ensuite au cours de sa traversée des voies génitales femelles. Ces différentes étapes de maturation vont permettre au spermatozoïde d'être fonctionnel, mobile et d'acquérir son pouvoir fécondant. En effet, au cours de leur migration dans les voies génitales femelles, les spermatozoïdes migrent dans le vagin, puis l'utérus et enfin les trompes de Fallope (ou trompes utérines) jusqu'à l'ampoule, lieu de rencontre avec l'ovocyte. Les spermatozoïdes achèveront alors leur maturation en réalisant leur capacitation et leur réaction acrosomique. Cette ultime étape de maturation facilite ainsi leur passage au travers des cellules du cumulus et leur permet de traverser la zone pellucide de l'ovocyte pour enfin atteindre l'espace périvitellin où ils pourront interagir avec la membrane plasmique ovocytaire. Au cours de l'interaction gamétique, un unique spermatozoïde pourra alors adhérer puis fusionner avec la membrane ovocytaire, permettant l'union de leur matériel génétique et la création d'une cellule œuf diploïde.

Du point de vue morphologique, le spermatozoïde est une cellule présentant une tête et un flagelle (Figure 1). Sa tête, au sein de laquelle on retrouve le noyau et donc l'information génétique, est recouverte, sur sa face antérieure, d'un « capuchon » appelé acrosome. Ce dernier renferme un certain nombre d'enzymes qui, une fois libérées, permettront aux spermatozoïdes de traverser les barrières ovocytaires et de démasquer les protéines nécessaires aux étapes suivantes que sont celles de l'adhésion et de la fusion. Le flagelle est responsable de la mobilité du spermatozoïde. Il est composé de quatre segments : la pièce connective (ancrée sur le noyau, située à la base du flagelle), la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. Le flagelle est constitué d'une structure centrale appelée axonème (neuf doublets de microtubules qui entourent une paire centrale de microtubules) qui se forme à partir des deux centrioles et qui parcourt les pièces intermédiaire, principale et terminale. La pièce intermédiaire est entourée d'un manchon mitochondrial permettant l'apport d'énergie nécessaire au battement du flagelle.

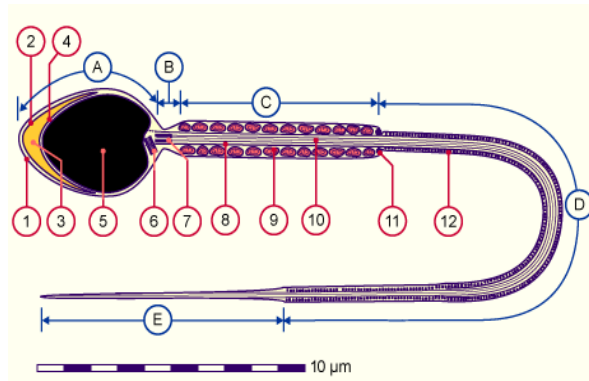


Figure 1 : Représentation schématique d'un spermatozoïde mature de Mammifère (de www.embryology.ch) 1 : Membrane plasmique, 2 : Membrane acrosomiale externe, 3 : Acrosome, 4 : Membrane acrosomiale interne, 5 : Noyau, 6 : Centriole proximal, 7 : Restes du centriole distal, 8 : Faisceaux longitudinaux extérieurs denses, 9 : Mitochondrie, 10 : Axonème, 11 : Annulus, 12 : Fibres denses externes.

A : Tête, B : Collet, C : Pièce intermédiaire, D : Pièce principale, E : Pièce terminale

I.2. La spermatogénèse

Les spermatozoïdes sont produits dans les gonades mâles à savoir les testicules. Le testicule, homologue de l'ovaire chez la femelle, exerce une double fonction : la spermatogénèse, ou formation des gamètes mâles, les spermatozoïdes ; et la stéroïdogénèse, ou production d'hormones mâles, en particulier la testostérone.

A l'intérieur du testicule on retrouve des cavités appelées lobules testiculaires (Figure 2). C'est au sein de ces lobules que se trouvent les tubes séminifères, siège de la spermatogénèse. Il y a plusieurs centaines de lobules par testicule (200 à 300) et chacun d'entre eux renferme 2 à 3 tubes séminifères pelotonnés sur eux-mêmes. Une fois produits dans les tubes séminifères, les spermatozoïdes rejoignent les tubes droits puis le *rete testis* avant de se retrouver dans les canaux efférents. Ils quittent alors le testicule et rallient l'épididyme qui assurera leur maturation et leur conservation.

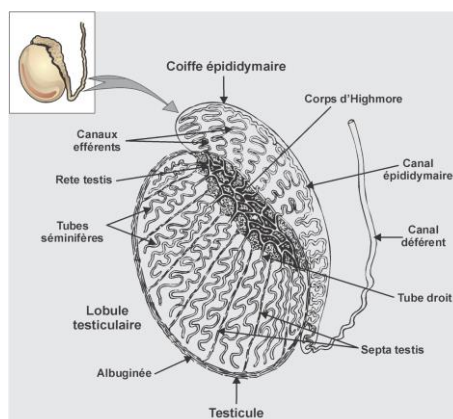


Figure 2 : Schéma du testicule et de l'épididyme, lieux de la spermatogénèse et de la maturation du gamète mâle, chez l'homme (de www.ipubli.inserm.fr)

La spermatogenèse est définie comme la production de spermatozoïdes et est constituée de trois phases successives : la prolifération mitotique qui permet l'auto-renouvellement des spermatogonies, la spermatocytogenèse qui est l'étape de différenciation des spermatogonies en spermatides rondes, puis la spermiogenèse qui est une phase de cytodifférenciation des spermatides rondes en spermatozoïdes. Au cours de ce processus, les cellules germinales en différenciation vont migrer de la périphérie vers la lumière du tube séminifère. Ainsi, au niveau basal des tubes séminifères, se trouvent les cellules les moins différenciées, les spermatogonies, et dans la lumière du tube séminifère, on observe la libération des cellules les plus différenciées, les spermatozoïdes (Figure 3).

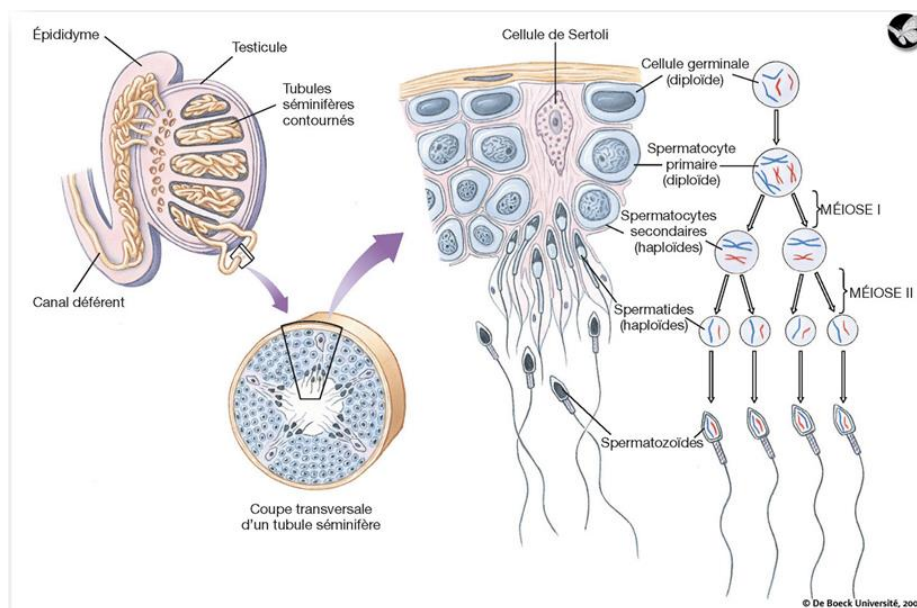


Figure 3 : Représentation schématique de la spermatogenèse sur une coupe transversale d'un tube séminifère (De Boeck Université, 2007)
Représentation des différentes étapes de la spermatogenèse humaine et leur localisation dans le testicule

A la naissance, seules les spermatogonies, les cellules souches germinales, sont déjà présentes. Ce n'est qu'à la puberté que les spermatogonies sortent de leur quiescence et vont proliférer par mitose pour former un pool de réserve, c'est le début de la spermatogenèse.

I.2.a. La prolifération mitotique

La prolifération mitotique, ou vague mitotique des spermatogonies, correspond à la division par mitose des spermatogonies. Parmi les spermatogonies issues de ces divisions mitotiques, certaines resteront quiescentes afin de maintenir un pool de spermatogonies souches, et d'autres s'engageront dans la voie de différenciation. Les cellules germinales s'engageant dans le processus de différenciation sont alors appelées spermatogonies post-

mitotiques ou spermatocytes I. La cohorte de spermatocytes I adjacents qui entrent de façon synchrone en différenciation, c'est-à-dire issus d'une même vague mitotique et d'une même spermatogonie souche, est décrite comme appartenant à la même génération. Les cellules germinales d'une même génération restent liées entre elles par des ponts cytoplasmiques durant leur avancée dans la différenciation, ce qui permet des échanges entre les futurs gamètes d'une même génération.

I.2.b. La spermatocytogenèse

La spermatocytogenèse correspond à la différenciation des spermatogonies diploïdes en spermatozoïdes haploïdes. Elle s'effectue à partir des spermatogonies qui sont localisées au niveau basal des tubes séminifères. Ces dernières, après s'être multipliées lors de la prolifération mitotique, entrent dans un processus de différenciation en devenant des spermatocytes I. Les spermatocytes I vont alors se diviser par méiose (Figure 4).

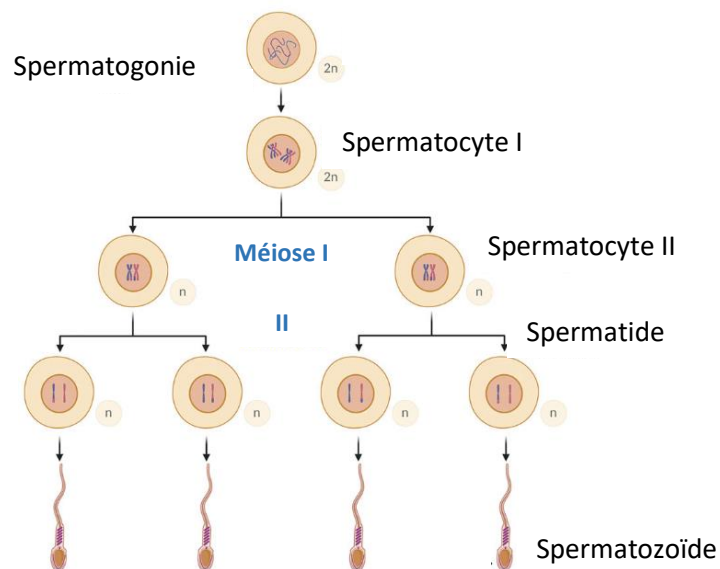


Figure 4 : Représentation schématique de la méiose au cours de la spermatogenèse (D'après Siu et al. 2021)

La méiose est un processus qui correspond à la succession de deux divisions cellulaires sans réplication d'ADN. Elle est constituée de deux divisions : l'une réductionnelle, l'autre équationnelle. La division réductionnelle permet la séparation des lots de chromosomes, obtenant ainsi des cellules haploïdes. La division équationnelle correspond quant à elle à la séparation des 2 chromatides de chaque chromosome. Ainsi, les spermatocytes I, constitués de deux lots de chromosomes (diploïdes) à deux chromatides, deviennent après la première division de méiose, des spermatocytes II. Les spermatocytes II sont constitués d'un seul lot de

chromosomes (haploïde) à deux chromatides. Ensuite, la seconde division de méiose va, à partir des spermatocytes II, permettre de former les spermatides rondes qui sont constituées d'un seul lot de chromosomes (haploïdes) à une chromatide. A partir d'un spermatocyte I, la première division de méiose permet de former deux spermatocytes II, qui eux-mêmes se diviseront en deux lors de la seconde division de méiose pour former chacun deux spermatides ronds. Ainsi, la méiose permet de former quatre spermatides ronds haploïdes à partir d'un spermatocyte I diploïde (Figure 4).

Les spermatides ronds ainsi formées vont alors réaliser une différenciation morphologique et biologique, leur permettant de devenir des spermatozoïdes, au cours d'un processus appelé spermiogénèse.

I.2.c. La spermiogénèse

La cytodifférenciation des spermatides ronds en spermatozoïdes est appelée spermiogénèse. Au cours de ce processus physiologique, les spermatides ronds vont devenir dans l'ordre de différenciation croissante : des spermatides en allongements, des spermatides allongées, et enfin des spermatides matures. Au cours de la spermiogénèse, quatre phénomènes principaux se produisent : la réorganisation du noyau, l'apparition et la formation de l'acrosome, l'assemblage du flagelle et l'élimination des corps résiduels (Figure 5).

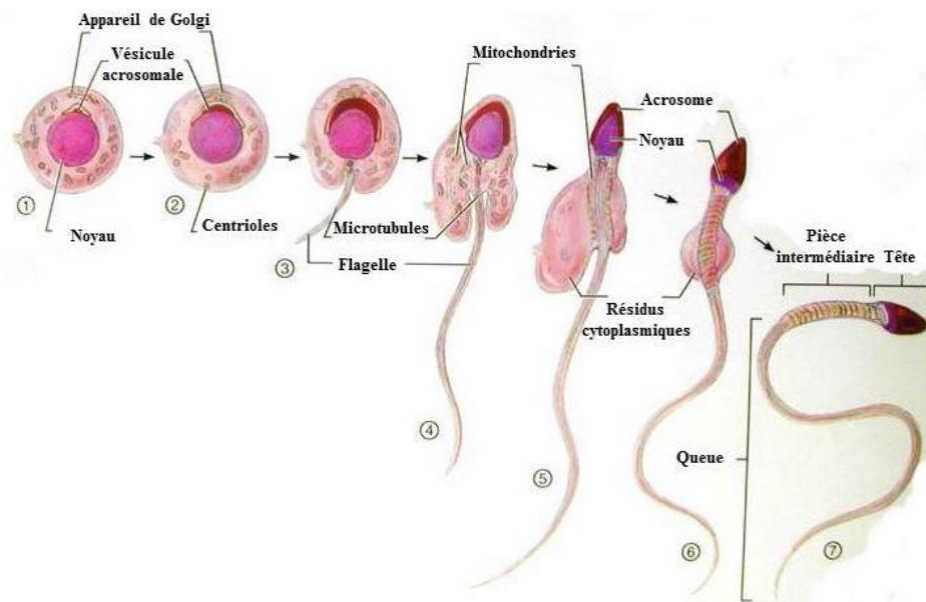


Figure 5 : Schéma récapitulatif des modifications nucléaires et cytoplasmiques au cours de la spermiogénèse (de www.histologistes.org)

A leur formation, les spermatides rondes présentent un noyau dont l'ADN est relativement décondensé. Au cours de leur maturation, les spermatides acquièrent une chromatine très condensée et le noyau prend alors une forme ovoïde. Cette condensation de la chromatine est due au remplacement des histones par des protamines. Les histones sont de petites protéines, qui régulent la compaction de la chromatine et de ce fait interviennent dans la régulation de l'expression des gènes. Les histones sont progressivement remplacées par des variants d'histones testiculaires, puis par des protéines de transition, qui elles-mêmes seront ensuite substituées par des protamines. Ce remplacement est progressif au cours de la spermiogenèse, et ce n'est qu'au stade de spermatides matures que la majorité des histones aura été remplacée par les protamines. La présence des protamines, qui assurent un niveau maximal de compaction de l'ADN, est transitoire et elles seront remplacées par les histones dans le cas d'une fécondation, immédiatement après l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte. La condensation de la chromatine assure deux fonctions : la réduction de la taille du noyau en facilitant le conditionnement de l'ADN, et une protection du matériel génétique.

Les spermatides, au départ rondes, vont s'allonger de plus en plus au cours de la spermiogenèse. Dans ce même temps, une grande partie du volume cytoplasmique va être éliminé. Le cytoplasme, et les éléments cellulaires qu'il contient, va d'abord se déplacer vers l'arrière de la tête spermatique (au niveau du col). Ensuite, le cytoplasme sera éliminé via la formation de corps résiduels (cytoplasme en excès contenant les organites à éliminer) qui sont relargués puis phagocytés par les cellules de Sertoli mais également par autophagie (Buschiazzi et al. 2019). Il a été montré que l'élimination des corps résiduels était régulée par la protéine SPEM1 (Zheng et al. 2007).

Je vais maintenant détailler plus longuement les parties en relation avec mes travaux de thèse, à savoir la mise en place de l'acrosome et l'assemblage du flagelle.

I.2.c.1. La mise en place de l'acrosome

L'acrosome se met en place lors de la spermiogenèse, ce qui correspond au passage de spermatide ronde à spermatozoïde. L'acrosome constitue une vésicule contenant des enzymes hydrolytiques et protéolytiques dont le relargage, et donc l'action, sera essentielle lors de l'adhésion/fusion gamétique (Tulsiani et al. 1998). L'acrosome est composé de deux parties : une partie antérieure qui recouvre le noyau, et le segment équatorial situé dans la partie postérieure. Le segment équatorial sépare la région acrosomale (à l'avant) de la région post-acrosomale (à l'arrière) et sera la structure de l'acrosome qui subsistera après la réaction acrosomique (Berruti 2016). La membrane acrosomale interne est accolée au noyau alors que la membrane acrosomale externe est située immédiatement sous la membrane plasmique.

L'origine de l'acrosome est débattue encore aujourd'hui. Certains définissent l'origine de l'acrosome comme dérivant de l'appareil de Golgi, d'autres le considèrent comme un organe lié aux lysosomes (Berruti 2016; Moreno et Alvarado 2006). La mise en place de l'acrosome se déroule en quatre phases successives : la phase de Golgi, la phase de capuchon, la phase de l'acrosome et enfin la phase de maturation (Figure 6) (Xiong, Shen, et Wang 2021).

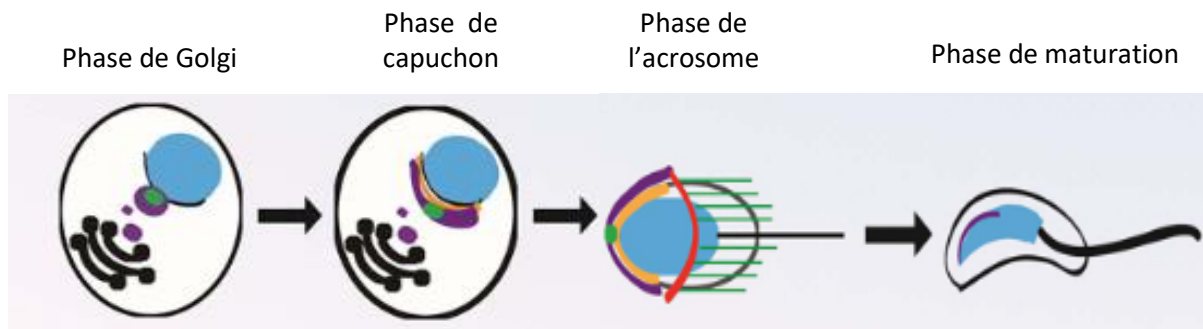


Figure 6 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la mise en place de l'acrosome (d'après Xiong et al. 2021)

Durant la phase de Golgi, le réticulum endoplasmique produit des protéines qui sont ensuite traitées par l'appareil de Golgi, prises en charge par le réseau trans-Golgien d'où bourgeonnent les vésicules pro-acrosomales. Ces dernières migrent et s'accumulent à la surface du noyau, transportées par les microtubules, puis fusionnent entre elles afin de former un granule acrosomale unique (Khawar, Gao, et Li 2019; Moreno et Alvarado 2006). Lors de la phase de capuchon, la taille de la vésicule acrosomale augmente grâce aux vésicules dérivées de l'appareil de Golgi. La vésicule acrosomale prend la forme d'une structure de type capuchon qui recouvre le noyau jusqu'à progressivement recouvrir 1/3 de sa surface. Toujours au cours de la phase de capuchon, l'acroplaxome, une structure composée de cytosquelette (kératine et actine-F), apparaît et se met en place entre la membrane acrosomale interne et la membrane nucléaire. L'acroplaxome sert de support à la biogenèse de l'acrosome et permet son ancrage au noyau. Il est constitué d'un anneau marginal qui sert de plaque acrosomale. Durant l'étape de l'acrosome, le granule acrosomal s'ancre à l'acroplaxome au travers de sa membrane interne. De plus, il ne grandit plus mais se condense. En parallèle lors de cette phase, la manchette se forme. Il s'agit d'une structure issue du cytosquelette (microtubules et actine-F) qui présente des projections de microtubules à partir de l'anneau périnucléaire en direction du flagelle (Wei et Yang 2018). Cette structure est transitoire puisqu'elle n'est présente que lors de la phase d'élongation des spermatozoïdes. La fonction de la manchette est double. D'une part, son rôle est d'aider à la condensation et à l'élongation de la tête spermatique en exerçant une force mécanique contractile au niveau de l'anneau périnucléaire. D'autre part, les microtubules de la manchette qui se projettent en direction du flagelle servent de support pour assurer le transport des protéines nécessaires à l'assemblage du flagelle. Lors de la dernière phase de biogenèse de l'acrosome, celle de maturation, le granule acrosomal continue de s'étendre sur le pôle antérieur du noyau par fusion avec

d'autres vésicules dérivées de l'appareil de Golgi jusqu'à recouvrir la quasi-totalité de la surface nucléaire, hormis la zone reliée au flagelle (Xiong, Shen, et Wang 2021). Il se produit donc de nombreux échanges depuis le réticulum endoplasmique vers le futur acrosome en passant par l'appareil de Golgi.

Toutes les protéines intervenant dans le transport des vésicules entre ces organites sont essentielles à la mise en place correcte de l'acrosome. Par ailleurs, la mise en place de la manchette ainsi que sa connexion avec le noyau est essentielle pour l'acquisition de la forme de la tête spermatique (M. S. Lehti et Sironen 2016). En effet, l'étude des modèles souris KO pour des protéines impliquées dans le transport intra-flagellaire (KIF3A, IFT88) ou associées aux microtubules (HOOK1, FU, KATNB1, CEP131), a montré que leurs spermatozoïdes présentent une tête spermatique ronde (M. S. Lehti et Sironen 2016; Mari S. Lehti, Kotaja, et Sironen 2013; Kierszenbaum et al. 2011; Akhmanova et al. 2005; Mendoza-Lujambio 2002; Nozawa et al. 2014; O'Donnell et al. 2012; Li et al. 2015; Hall et al. 2013). En effet, l'absence de ces protéines entraîne une élongation anormale de la manchette ainsi qu'un retard de la constriction de l'anneau périnucléaire, ce qui résulte en la formation d'une tête spermatique ronde (M. S. Lehti et Sironen 2016). De plus, l'absence d'une connexion entre la manchette et le noyau entraîne elle aussi un défaut morphologique des tête des spermatozoïdes qui sont alors rondes (M. S. Lehti et Sironen 2016; Pasch et al. 2015; Ito et al. 2004). Le complexe acrosome-acroplaxome-manchette permet donc l'ancrage de l'acrosome au noyau. En effet, d'une part l'acroplaxome via son anneau marginal et d'autre part la manchette via son anneau périnucléaire sont connectés au noyau (Xiong, Shen, et Wang 2021). Enfin, ce complexe acrosome-acroplaxome-manchette joue de multiples rôles : la formation de l'acrosome (sa mise en place et sa forme), l'ancrage de l'acrosome à l'enveloppe nucléaire, l'élongation et la condensation du noyau, le transport intra-flagellaire (pour la formation du flagelle). Du fait de l'ensemble de ces actions, le complexe acrosome-acroplaxome-manchette influe sur la forme de la tête spermatique (Xiong, Shen, et Wang 2021; Manfredola et al. 2021; M. S. Lehti et Sironen 2016; Kierszenbaum et Tres 2004).

Sur le plan fonctionnel, l'acrosome s'apparente à un lysosome et contient donc tout comme lui des enzymes hydrolytiques telles que des hyaluronidases, hydrolases, ou des protéinases neutres comme l'acrosine.

Lors de la réaction acrosomique, l'acrosome se vide de son contenu et relargue des enzymes nécessaires aux spermatozoïdes pour traverser les cellules du cumulus et la zone pellucide (Otčenášková et al. 2023). Par ailleurs, on observe également lors de cette étape, la relocalisation de protéines essentielles à l'interaction gamétique (Satouh et al. 2012; Barbaux et al. 2020). La réaction acrosomique constitue donc une étape indispensable de la fécondation (Bedford 2011). De ce fait, un spermatozoïde n'ayant pas réalisé sa réaction acrosomique ne sera pas en capacité de pouvoir féconder l'ovocyte (Khawar, Gao, et Li 2019). En effet, la réalisation d'ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection) avec des spermatozoïdes qui présentent des défauts de leur acrosome ne permet pas d'obtenir une fécondation, à moins d'activer l'ovocyte artificiellement en parallèle (Nasr-Esfahani et al. 2008; Tavalaei et al.

2023). La nécessité d'activer artificiellement l'ovocyte est due au fait que les patients globozoospermiques ont des spermatozoïdes qui expriment peu ou pas la PLC ζ , qui est le facteur spermatique majeur de l'activation ovocytaire (Eskandari et al. 2018 ; M. Tavalae et Nasr-Esfahani 2016). Il a cependant été montré que chez certaines espèces la présence de l'acrosome sur le spermatozoïde utilisé lors de l'ICSI affecterait le développement embryonnaire (Morozumi et Yanagimachi 2005). Néanmoins, pour les spermatozoïdes humains et murins il n'est pas nécessaire de leur ôter leur acrosome pour l'ICSI, même si c'est préférable en théorie (Morozumi et Yanagimachi 2005). Ainsi, une anomalie lors de la mise en place de l'acrosome peut entraîner des défauts lors de l'étape de fusion gamétique et par conséquent des problèmes de fertilité pouvant aller de l'hypofertilité jusqu'à la stérilité totale (Modarres, Tavalae, et Ghaedi 2019). Le mécanisme de la biogenèse de l'acrosome a été décrit mais du point de vue moléculaire et de régulation du mécanisme, des inconnues subsistent encore.

I.2.c.2. L'assemblage du flagelle

Le flagelle est responsable de la mobilité du spermatozoïde. Il se compose de quatre segments (de proximal à distal) : la pièce connective ou cou (ancrée sur le noyau, située à la base du flagelle), la pièce intermédiaire, la pièce principale et enfin la pièce terminale. La chronologie de la mise en place de ces différents segments s'effectue en suivant ce même ordre (Figure 7).

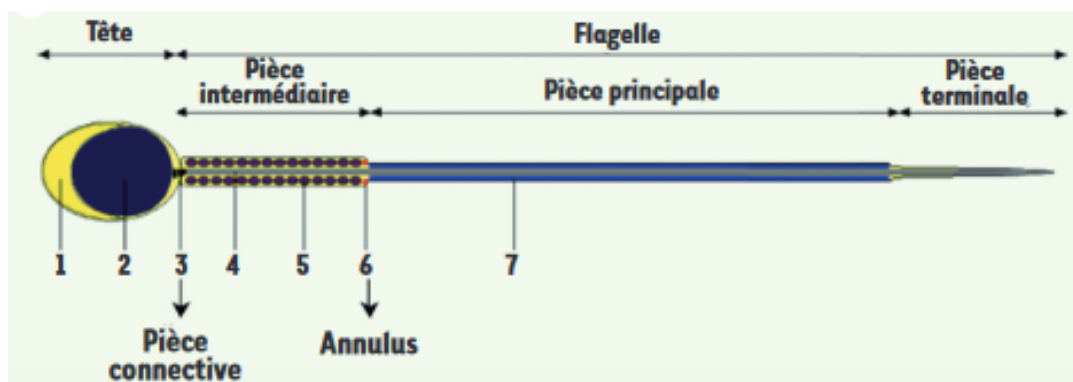


Figure 7 : Représentation schématique d'un spermatozoïde et de la composition de son flagelle (de Escalier et Touré 2012)

1 : Acrosome, 2 : Noyau, 3 : Pièce connective, 4 : axonème, 5 : Mitochondries, 6 : Annulus, 7 : Gaine fibreuse

La tête spermatique et le flagelle sont liés entre eux au niveau du cou aussi appelé la pièce connective (Pereira et Sousa 2023). L'axonème, qui constitue l'élément central et principal du flagelle, s'étend tout le long du flagelle et assure la mobilité du spermatozoïde. Cette structure centrale du flagelle, est composée de neuf doublets de microtubules

périphériques qui entourent une paire centrale de microtubules (structure en 9 doublets + 2 microtubules simples ou singulets) (Yogo 2022). Les bras de dynéines, qui sont des complexes ATP-asiques, ou moteurs moléculaires, permettent de relier entre eux les microtubules périphériques de l'axonème. Chaque paire de microtubules périphériques est reliée à la paire de microtubule centrale par des ponts radiaires (Figure 8) (Ray et al. 2017). L'axonème est entouré de structures périaxonémales qui sont, suivant les segments du flagelle : les fibres denses, les mitochondries et la gaine fibreuse. Au niveau de la pièce intermédiaire, l'axonème et les fibres denses sont entourés par la gaine mitochondriale. Les mitochondries représentent une source d'énergie nécessaire aux battements du flagelle et donc à la mobilité du spermatozoïde. A la jonction entre les pièces intermédiaire et principale on retrouve une structure dense aux électrons en microscopie électronique appelée annulus ou anneau de Jensen. La pièce principale est constituée de l'axonème, associé ou non aux fibres denses, et entouré par la gaine fibreuse. Enfin, au niveau de la pièce terminale, on ne retrouve que l'axonème sans structures périaxonémales (Escalier et Touré 2012).

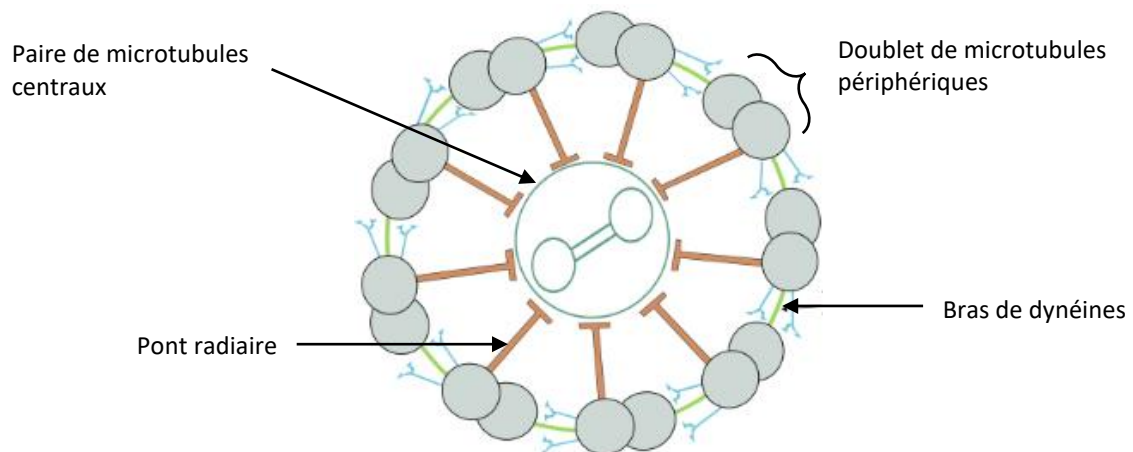


Figure 8 : Représentation schématique de l'axonème (D'après *Pereira et Sousa 2023*)

La mise en place du flagelle débute par l'élongation du centriole distal. Les centrioles sont des structures cylindriques qu'on retrouve sous forme de paires, les deux centrioles étant disposés perpendiculairement l'un à l'autre. Chacun des centrioles est constitué de neuf triplets de microtubules. Les deux centrioles sont situés dans la pièce connective du flagelle, qui est reliée au noyau et permet ainsi la liaison entre la tête spermatique et le flagelle (Escalier et Touré 2012). Le centriole le plus proche de la tête est appelé centriole proximal et jouerait un rôle dans l'organisation de la région du cou et dans l'établissement de la manchette (Avidor-Reiss et al. 2019). Lors de la formation du flagelle, c'est le centriole distal, le plus éloigné de la tête, dont les microtubules vont s'étendre pour servir de matrice à la formation de neuf doublets de microtubules qui constitueront l'axonème (Pereira et Sousa 2023).

Une fois la mise en place de l'axonème initiée, le flagelle poursuit sa formation avec une phase d'élongation au cours de laquelle se mettent en place les structures périaxonémales (fibres denses et gaines mitochondriale et fibreuse). Pour cela, deux types de transports de protéines sont nécessaires : d'une part le transport intra-manchette et d'autre part le transport intra-flagellaire (O'Donnell et O'Bryan 2014).

La manchette, cette structure transitoire constituée de microtubules et de filaments d'actine, se met en place au début de la spermiogenèse et disparaît avant la mise en place de la pièce intermédiaire (Cf. I.2.c.1) (M. S. Lehti et Sironen 2016). La fonction de la manchette est double : d'une part elle participe à l'acquisition de la forme de la tête spermatique et d'autre part elle joue un rôle dans la formation du flagelle du fait de la projection de ses microtubules vers l'axonème (M. S. Lehti et Sironen 2016; Yogo 2022). En effet, cette structure se situe dans la partie caudale de la spermatide et est constituée d'un anneau périnucléaire puis elle projette des microtubules dans le cytoplasme de la spermatide en direction du futur flagelle (O'Donnell et O'Bryan 2014). Ainsi, certaines protéines sont présentes transitoirement dans la manchette puis transportées le long des microtubules de la manchette depuis l'appareil de Golgi en direction du flagelle en formation (O'Donnell et O'Bryan 2014; M. S. Lehti et Sironen 2016). Le transport intra-manchette joue donc un rôle important dans l'acheminement des protéines vers leur site d'assemblage (M. S. Lehti et Sironen 2016).

Le transport intra-flagellaire s'effectue via des protéines motrices, à savoir les kinésines (transport antérograde) et les dynéines (transport rétrograde), qui se déplacent le long des microtubules qui constituent l'axonème (Inaba 2011). Le transport intra-flagellaire antérograde correspond à un déplacement du cytosol vers la partie terminale du flagelle afin d'acheminer des éléments (protéines, lipides, ...) nécessaires à l'élongation de l'axonème. Le transport intra-flagellaire rétrograde est quant à lui un déplacement s'effectuant du flagelle vers le cytosol pour permettre de rapporter dans le cytosol les éléments inutiles au flagelle (Yogo 2022).

Ainsi, le transport intra-manchette et le transport intra-flagellaire coopèrent pour former le flagelle et ces deux types de transports sont essentiels à la formation du flagelle (Figure 9) (M. S. Lehti et Sironen 2016; Pereira et Sousa 2023).

Avant que l'axonème ne poursuive son extension et avant la mise en place de la gaine mitochondriale, l'annulus se forme à la base du flagelle. Ce n'est que lorsque le flagelle s'éloigne que l'annulus va migrer le long de l'axonème pour se placer à la fin de la pièce intermédiaire, se situant donc à la jonction entre les pièces intermédiaire et principale (Pereira et Sousa 2023). L'annulus est constitué majoritairement de protéines de la famille des septines (SEPT). Ces protéines sont associées aux microtubules et à la membrane (Yogo 2022). A la jonction entre les pièces intermédiaire et principale, l'annulus exerce un rôle d'organisateur morphologique du flagelle. En effet, il sert de guide pour le développement du flagelle ainsi que pour l'alignement des mitochondries. Par ailleurs, l'annulus joue également un rôle de

barrière de diffusion en empêchant la diffusion des protéines membranaires (Pereira et Sousa 2023).

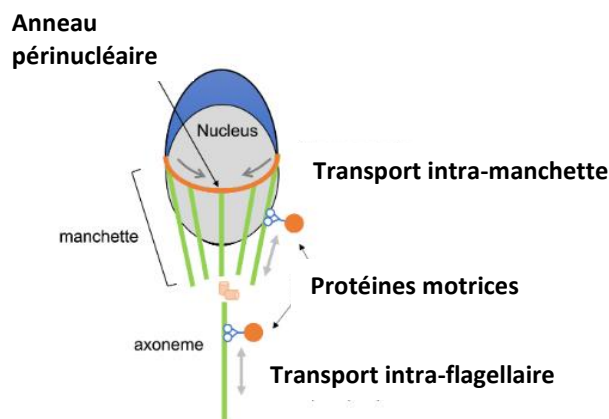


Figure 9 : Représentation schématique des transports intra-manchette et intra-flagellaire (D'après Yogo 2022)

La pièce intermédiaire, qui se situe juste derrière la pièce connective est composée de l'axonème qui est entouré de neuf fibres denses externes, elles-mêmes entourées par la gaine mitochondriale. Cette dernière a une forme hélicoïdale, les mitochondries en hélices (Pereira et Sousa 2023). Au cours de la mise en place de la gaine mitochondriale, on observe tout d'abord un alignement des mitochondries au niveau de la pièce intermédiaire, puis ces dernières subissent des changements de leur morphologie. En effet, lors de leur alignement les mitochondries sont sphériques, puis au fur et à mesure de la mise en place de la gaine mitochondriale, les mitochondries s'étalent pour prendre une forme de croissant, puis continuent ensuite à s'étaler afin de former la gaine mitochondriale (Yogo 2022). Cette dernière se termine au niveau de l'annulus.

Au niveau de la pièce principale, située immédiatement après l'annulus, on retrouve la gaine fibreuse entourant les fibres denses externes qui elles-mêmes entourent l'axonème situé au centre (Ray et al. 2017; Yogo 2022; Pereira et Sousa 2023). Les fibres denses externes ainsi que la gaine fibreuse exercent des fonctions de protection de l'axonème en assurant l'intégrité structurale du flagelle ainsi que son élasticité et la résistance de la gaine. Toutes ces fonctions permettent de favoriser la mobilité spermatique (Yogo 2022; Pereira et Sousa 2023).

La pièce terminale, située en aval de la pièce principale, débute là où la gaine fibreuse n'est plus présente (Pereira et Sousa 2023). En effet, la pièce terminale ne comporte que des structures axonémales, et aucune structure périaxonémales n'est présente (Ray et al. 2017). Dans la région distale de la pièce terminale, l'axonème se désorganise et les microtubules ne se retrouvent plus en doublets mais en singulets (Pereira et Sousa 2023).

A la fin de la spermiogenèse, les spermatides sont matures, allongées, condensées, et sont encore enchâssées dans l'épithélium germinal. Elles ne seront appelées spermatozoïdes que lorsqu'elles seront libérées dans la lumière du tube séminifère lors du processus appelé spermiation. Les spermatozoïdes sont alors transportés dans les tubes droits qui s'abouchent ensuite dans un réseau de canaux appelé le *rete testis*. Ils passent alors dans les cônes efférents où ils rejoignent un canal nommé épидидyme. Ceci marque la sortie des spermatozoïdes hors du testicule.

I.2.d. La maturation post-testiculaire

A la fin de la spermatogenèse, les spermatozoïdes ainsi produits sont immobiles et immatures. Ils vont alors devoir subir une maturation post-testiculaire :

- Tout d'abord, une maturation au cours de leur passage dans l'épididyme. Ceci leur permet d'acquérir leur motilité et leur pouvoir fécondant.
- Puis, une maturation au cours de leur passage dans les voies génitales femelles. Cette maturation fonctionnelle est essentielle au spermatozoïde pour pouvoir féconder l'ovocyte. Il s'agit de la capacitation et de la réaction acrosomique.

I.2.d.1. La maturation épидидymaire

Une fois libérés dans la lumière du tube séminifère, les spermatozoïdes ne sont pas encore aptes à féconder. En effet, ils sont immatures, immobiles et n'ont pas encore acquis leur pouvoir fécondant. L'épididyme, organe essentiel du système reproducteur mâle, est accolé au testicule. Cet organe est le siège de l'acquisition de leur mobilité et de leur pouvoir fécondant. Il est composé de trois segments anatomiques distincts : la tête, le corps, et la queue de l'épididyme. L'expression des gènes le long de ce tubule est très segmentée et hautement régulée par différents facteurs. Les spermatozoïdes parcourent tout le canal épидидymaire jusqu'à rejoindre la queue de l'épididyme qui constitue le lieu de stockage et de conservation des spermatozoïdes avant l'éjaculation et qui se poursuit par le canal déférent.

Le long de leur trajet au sein de l'épididyme, les changements morphologiques des spermatozoïdes continuent : l'ADN poursuit sa condensation, et le cytoplasme diminue encore de volume, produisant ainsi une tête spermatique plus petite et plus compacte. C'est également au cours de leur traversée de l'épididyme que les spermatozoïdes subissent des restructurations au niveau de leur membrane plasmique. Ces modifications membranaires permettent l'exposition de protéines essentielles à l'interaction gamétique. Par ailleurs, le masquage des sites antigéniques à la surface du spermatozoïde permet d'assurer sa protection d'éventuelles agressions lors de la traversée des voies génitales femelles. Dans

l'ensemble, ces changements au niveau membranaire produisent des effets sur la motilité et sur l'aptitude à poursuivre la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes, à savoir la capacitation et la réaction acrosomique.

I.2.d.2. La capacitation

Lors de l'accouplement, les spermatozoïdes sont éjaculés dans la partie postérieure du vagin, à l'entrée du col de l'utérus. L'éjaculation constitue une étape de maturation en elle-même. En effet, les spermatozoïdes vont alors subir une stimulation mécanique, l'éjaculation, et une stimulation chimique, due aux sécrétions des différentes glandes du tractus génital mâle qui constituent le liquide séminal. Ceci entraîne l'activation de leur aptitude à la mobilité, et les spermatozoïdes sont alors capables de poursuivre leur maturation avec la capacitation et la réaction acrosomique.

Une fois déposés au fond du vagin, les spermatozoïdes vont alors migrer du vagin vers l'utérus en traversant le col de l'utérus et la glaire cervicale qui s'y trouve. Arrivés dans l'utérus, les spermatozoïdes vont migrer dans les trompes utérines (ou trompes de Fallope) jusqu'à atteindre l'ampoule tubaire. C'est dans l'ampoule tubaire que l'ovocyte a été expulsé par l'ovaire adjacent à la trompe utérine, et c'est ici que se produira la fécondation. La traversée des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles induit leur capacitation, étape indispensable pour faire ensuite leur réaction acrosomique et ainsi pouvoir féconder l'ovocyte.

La capacitation est une maturation fonctionnelle qui se produit au contact des sécrétions du tractus génital femelle. Au cours de ce processus, les spermatozoïdes subissent un remaniement de leurs constituants membranaires. En effet, la présence d'accepteurs de cholestérol dans les sécrétions génitales femelles induit le démasquage des récepteurs membranaires spermatiques. Ce processus permet donc d'exposer à la membrane et de rendre ainsi accessibles les récepteurs membranaires spermatiques qui entreront en jeu lors de l'interaction avec l'ovocyte et ses enveloppes. Par ailleurs, ces remaniements membranaires rendent possible la réaction acrosomique, indispensable à la fécondation. De plus, les modifications membranaires spermatiques ont des conséquences sur la motilité des spermatozoïdes (Pitnick, Wolfner, et Dorus 2020). En effet, c'est au cours de la capacitation que les spermatozoïdes acquièrent une motilité de type hyperactivité. Ce mouvement consiste notamment en l'augmentation de la fréquence des battements du flagelle, mouvements dits en coups de fouet. On observe également une modification des trajectoires des têtes spermatiques qui réalisent des mouvements amples induisant un déplacement des spermatozoïdes de type pendulaires latéraux.

De façon plus globale, la capacitation est caractérisée par des remaniements membranaires spermatiques comme par exemple l'enlèvement du cholestérol libre ou encore

l'hyperphosphorylation des tyrosines (Bailey 2010). La capacitation des spermatozoïdes induit l'hyperactivité des spermatozoïdes et ainsi leur capacité à poursuivre leur maturation par la réaction acrosomique.

I.2.d.3. La réaction acrosomique

La réaction acrosomique des spermatozoïdes est un préalable indispensable à l'interaction des membranes gamétiques. En effet, pour pouvoir traverser les enveloppes de l'ovocyte et atteindre la membrane plasmique ovocytaire et fusionner avec, les spermatozoïdes doivent avoir réalisé leur réaction acrosomique. En effet, seuls les spermatozoïdes acrosomes réagis auront la capacité de fusionner avec l'ovocyte.

Dans l'acrosome, on retrouve des composés solubles mais également une structure appelée matrice acrosomale (Buffone, Hirohashi, et Gerton 2014). La matrice acrosomale est quant à elle constituée d'enzymes (protéases, glycohydrolases : acrosine, cathepsines D et L, hyaluronidase β -D-glucuronidase, α -L-fucosidase, ...) ainsi que de protéines de liaison à la zone pellucide telles que ZP3R/sp56 (anciennement p56), zonadhesin, β -1,4 galactosyltransferase, ou encore SED-1 (Tulsiani et al. 1998; Buffone, Foster, et Gerton 2008; Buffone et al. 2008).

La réaction acrosomique des spermatozoïdes se produit avant la rencontre avec l'ovocyte ou aux abords de ce dernier et de ses enveloppes, à savoir les cellules du cumulus et la zone pellucide (Hirohashi et Yanagimachi 2018). Au cours de ce processus, le contenu de l'acrosome est libéré, relarguant ainsi de nombreuses enzymes. En effet, des pores se forment tout le long de l'acrosome du fait de la fusion de la membrane plasmique spermatique avec la membrane acrosomique externe située immédiatement en dessous (Figure 10) (Buffone et al. 2009). Les pores s'agrandissent de plus en plus jusqu'à la libération de la totalité du contenu de l'acrosome. Ainsi, à l'avant du spermatozoïde, la membrane acrosomique interne, qui est reliée au noyau par l'acroplaxome, devient alors la membrane plasmique spermatique. On distingue alors la région acrosomale à l'avant, immédiatement suivie par la région post-acrosomale, et le segment équatorial qui correspond à la jonction entre ces deux régions.

Différents scénarii ont été proposés concernant le site exact où se produit la réaction acrosomique, définissant ainsi deux modèles. Selon la littérature, la réaction acrosomique pourrait se produire (Buffone, Hirohashi, et Gerton 2014) :

- Aux abords des cellules du cumulus, induite par la présence de facteurs sécrétés par les cellules du cumulus ou présents dans le milieu
- A la surface des cellules du cumulus, induite par des facteurs solubles et la matrice du cumulus oophorus
- Au contact des cellules du cumulus, induite par contact avec les cellules du cumulus au sein du cumulus oophorus
- Au contact de la zone pellucide, induite par le contact avec les constituants de la zone pellucide, et notamment ZP3.

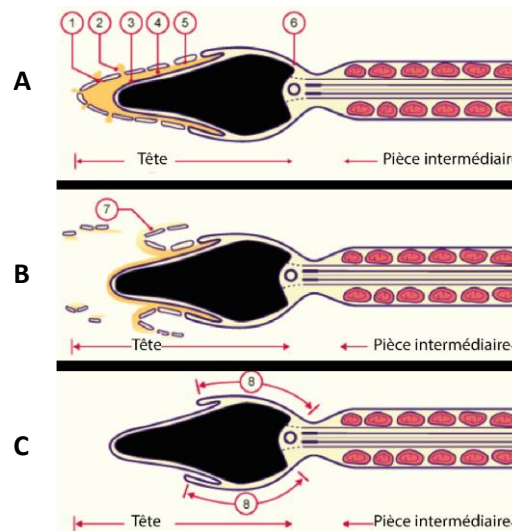


Figure 10 : Schéma de la réaction acrosomique du spermatozoïde (de www.embryology.ch)
A : Spermatozoïde « non acrosome réagi ». **B** : Spermatozoïde en cours de réaction acrosomique.
C : Spermatozoïde « acrosome réagi »
 1 : Pores 2 : Sortie du contenu acrosomique 3 : Membrane acrosomique interne
 4 : Contenu acrosomique (enzymes) 5 : Membrane acrosomique externe
 6 : Membrane cellulaire 7 : Restes de membranes qui se décrochent
 8 : Zone membranaire post-acrosomique

Deux grands modèles émergent de ces scénarios : le modèle de réaction acrosomique, et le modèle d'exocytose de l'acrosome (Buffone et al. 2008). Dans le modèle dit de réaction acrosomique, celle-ci se déroulerait lors du contact du spermatozoïde avec la zone pellucide et des protéines qui la composent (ZP1, ZP2, ZP3) (Tanphaichitr et al. 2007). Dans le modèle d'exocytose de l'acrosome, ce serait les changements induits par la capacitation au niveau membranaire et de la région acrosomale qui induiraient l'exocytose de la matrice acrosomale et donc l'exposition des protéines acrosomales impliquées dans la liaison aux protéines de la zone pellucide. Dans ce modèle, l'exocytose du contenu de l'acrosome se produirait donc en amont de la traversée des cellules du cumulus et de la liaison avec la zone pellucide. Par ailleurs, dans ce modèle, plusieurs stades intermédiaires d'exocytose pourraient être décrits allant d'un spermatozoïde acrosome intact à un spermatozoïde acrosome réagi alors que dans le modèle dit de réaction acrosomique, le spermatozoïde passerait de façon quasi immédiate d'intact à réagi (K.-S. Kim et Gerton 2003; Buffone et al. 2009).

Ainsi, lors de la réaction acrosomique, ou de l'exocytose du contenu de la matrice acrosomale, la libération du contenu de l'acrosome est essentielle pour permettre au spermatozoïde de traverser la zone pellucide et féconder l'ovocyte.

Les enzymes acrosomales relarguées ou exposées à la membrane lors de la réaction acrosomique vont agir sur le milieu environnant et jouer un rôle pour faciliter la traversée des cellules du cumulus et de la zone pellucide par les spermatozoïdes. Par exemple, les hyaluronidases (SPAM1 – anciennement PH-20- et HYAL5), vont permettre de lyser l'acide hyaluronique qui est présent entre les cellules du cumulus et qui assure leur maintien entre

elles (E. Kim et al. 2005; Reitinger et al. 2007; E. Kim et al. 2008). Les cellules du cumulus vont alors se dissocier de plus en plus et permettre aux spermatozoïdes de traverser cette zone pour atteindre la zone pellucide. Ensuite, une autre protéine acrosomale, l'acrosine, va quant à elle avoir une action de type protéase. Elle va permettre de digérer localement la zone pellucide et ainsi rendre possible la traversée de la zone pellucide par le spermatozoïde. Cependant, les mâles Knock-Out (KO) *Acrosin* sont fertiles, ce qui suggère que le rôle de l'acrosine n'est pas indispensable à la digestion de la ZP, mais elle y participe (Baba et al. 1994; Mao et Yang 2013). Par ailleurs, lors de la réaction acrosomique on observe une relocalisation sur le segment équatorial de certaines protéines qui seront par la suite essentielles à l'interaction gamétique et qui seront ainsi localisées dans la zone où a lieu la fusion.

Enfin, après sa formation puis ses maturations, intra et extra testiculaires, le spermatozoïde est mature, fonctionnel et doté d'un pouvoir fécondant. Ainsi, après la traversée des cellules du cumulus et de la zone pellucide, le spermatozoïde est alors capable d'entrer en interaction avec l'ovocyte, tout d'abord en y adhérant, puis en fusionnant avec lui.

Les altérations de l'acrosome peuvent affecter sa morphologie (altération du trafic vésiculaire inter organites ou du complexe acroplaxome-acrosome-manchette induisant une altération de la forme de la tête spermatique) ou bien affecter sa fonction (altération du contenu de l'acrosome).

II. L'interaction gamétique

Après l'ensemble de la spermatogenèse et du transit épидидymaire pour former des spermatozoïdes mobiles, puis leur phase terminale de maturation durant la traversée des voies génitales femelles et leur passage au travers des cellules du cumulus et de la zone pellucide qui entourent l'ovocyte, les spermatozoïdes parviennent enfin à l'étape finale de la fécondation, à savoir l'interaction gamétique (Figure 11). Cette étape comporte différentes phases : la rencontre et la reconnaissance des gamètes entre eux, puis la reconnaissance spécifique entre les protéines membranaires spermatiques, situées sur son segment équatorial d'un côté et les récepteurs membranaires ovocytaires, situées dans la zone microvillaire de l'autre. Après leur reconnaissance, les gamètes adhèrent entre elles. Leur adhésion, si elle est suffisante et efficace, se poursuivra par la fusion de leurs membranes. Au préalable, la réaction acrosomique des spermatozoïdes leur permet de démasquer et relocaliser les protéines essentielles à l'interaction gamétique. Cette relocalisation permet à ces protéines de se situer au niveau du segment équatorial, zone de l'initiation de l'interaction des membranes spermatiques et ovocytaires.

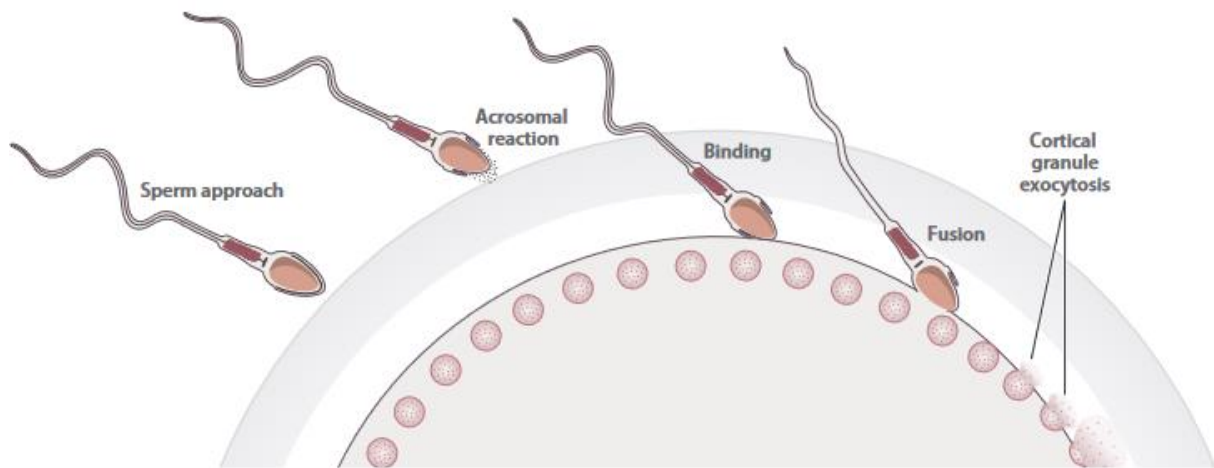


Figure 11 : Schéma des étapes clés de l'interaction gamétique : l'approche du spermatozoïde, sa traversée de la zone pellucide, son adhésion puis sa fusion avec la membrane plasmique ovocytaire (de Deneke et al. 2021)

L'interaction gamétique est définie comme une interaction de type « clef-serrure ». L'interaction des protéines gamétiques entre elles va dans un premier temps permettre de rapprocher les membranes plasmiques des gamètes de façon à obtenir l'adhésion des gamètes. L'adhésion des gamètes doit être efficace, c'est-à-dire que la force d'adhésion doit être bien particulière afin de rapprocher entre elles les membranes spermatique et ovocytaire, mais également laisser un espace entre elles afin que les protéines situées sur chacune des membranes puissent interagir entre elles sans qu'il y ait de gêne stérique (Brukman et al. 2019). En effet, l'adhésion gamétique doit être suffisante et efficace. Si la force d'adhésion entre les gamètes n'est pas bonne, alors l'étape de fusion ne sera pas initiée. Si l'adhésion gamétique est suffisante et efficace, elle aboutira à la fusion de leurs membranes : c'est la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde. La tête spermatique est alors internalisée et le matériel génétique qu'elle contient est transféré à l'intérieur du cytoplasme ovocytaire, ce qui aboutit à la formation d'une cellule œuf diploïde.

A ce jour, un certain nombre de protéines, ovocytaires et spermatiques ont pu être identifiées comme essentielles à l'interaction gamétique, et plus particulièrement à l'étape d'adhésion des gamètes. A l'aide de modèles murins, il a été montré qu'en l'absence de l'une de celles-ci, aucune fécondation n'était observée et que les spermatozoïdes restaient dans l'espace périvitellin sans parvenir à fusionner avec l'ovocyte. Pour certaines de ces protéines, leur implication dans la fécondation chez l'espèce humaine a pu être démontrée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre elles. Cependant, aucune d'entre elle n'a pu être identifiée comme la protéine responsable de la fusion proprement dite entre les membranes spermatique et ovocytaire. Elles sont donc essentielles à l'adhésion gamétique, mais leur seule présence ne permet pas d'aboutir à la fusion gamétique.

Actuellement, aucune protéine au pouvoir fusogénique n'a pu être identifiée comme l'acteur clef du processus de fusion gamétique. Il subsiste donc encore des inconnues pour

pouvoir décrire le mécanisme de l'interaction gamétique dans son entièreté. Comblé le manque de connaissance sur l'étape d'interaction gamétique, et plus particulièrement sur la fusion des gamètes, permettrait d'identifier les causes de certaines infertilités et d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour développer de nouveaux moyens de contraception.

Néanmoins, ces dernières années ont permis de découvrir de nouvelles protéines essentielles à l'adhésion gamétique. Ainsi, au total, neuf protéines sont connues pour être essentielles à cette étape, deux d'entre elles sont ovocytaires et les autres sont spermatiques.

Jusqu'à récemment, seulement trois protéines essentielles à l'adhésion des gamètes étaient connues. Deux d'entre elles sont ovocytaires, CD9 et JUNO, et l'autre est spermatique, IZUMO1 (Kaji et al. 2000; Inoue et al. 2005; Bianchi et al. 2014). Il a d'ailleurs été montré que lors de l'interaction gamétique, ces trois protéines se situaient au niveau des zones de contact puis d'adhésion/fusion des membranes plasmiques spermatique et ovocytaire (Chalbi et al. 2014). Ce n'est qu'à partir de 2020, qu'ont été décrites six autres protéines essentielles à l'adhésion des gamètes. Ces protéines spermatiques sont : SPACA6 (SPERM ACROSOME ASSOCIATED 6), SOF1 (SPERM-OOCYTE FUSION REQUIRED 1), TMEM95 (TRANSMEMBRANE PROTEIN 95), FIMP (FERTILIZATION INFLUENCING MEMBRANE PROTEIN), DCST1 et DCST2 (DENDROCYTE EXPRESSED SEVEN TRANSMEMBRANE PROTEIN DOMAIN-CONTAINING 1 et 2) (Barboux et al. 2020; Lamas-Toranzo et al. 2020; Fujihara et al. 2020; Noda et al. 2020; 2022; Inoue, Hagihara, et Wada 2021).

II.1. CD9 : organisateur moléculaire

La première protéine identifiée comme indispensable à la fécondation a été la tétraspanine CD9 (F. Le Naour et al. 2000; Kaji et al. 2000; Miyado, Mekada, et Kobayashi 2000). CD9 est un organisateur moléculaire dont la présence est essentielle à l'adhésion gamétique. Les tétraspanines possèdent quatre domaines transmembranaires formant ainsi deux boucles extracellulaires de taille inégale (E Rubinstein et al. 2006). Elles sont exprimées à la membrane et interagissent entre elles ainsi qu'avec d'autres protéines membranaires, telles que les intégrines, de façon directe ou indirecte (Boucheix et Rubinstein 2001; Charrin et al. 2003; E Rubinstein et al. 2006). Du fait de cette grande capacité d'interaction, on parle de réseau de tétraspanines qui aurait un rôle dans la signalisation cellulaire en mettant en relation ces différents acteurs moléculaires (Eric Rubinstein et al. 1996; Charrin et al. 2003; François Le Naour et al. 2004; Charrin et al. 2009; 2014). Ainsi, du fait de leur réseau moléculaire, les tétraspanines, et notamment CD9, auraient un rôle d'organisateur de complexes moléculaires.

CD9 est une protéine ubiquitaire qui sur la membrane ovocytaire est exprimée au niveau de la zone microvillaire et son expression est enrichie au niveau des microvillosités (Runge et al. 2007). La génération d'une lignée KO *Cd9* a été réalisée, et les souris femelles de

cette lignée présentent une forte hypofertilité du fait d'un défaut d'adhésion/fusion gamétique. CD9, malgré le fait qu'elle ne soit pas elle-même une protéine d'adhésion proprement dite, est impliquée dans l'étape d'adhésion gamétique. Chez les femelles KO *Cd9*, les spermatozoïdes parviennent à l'ovocyte, traversent les cellules du cumulus et la zone pellucide mais n'adhèrent pas ou pas correctement à la membrane plasmique ovocytaire, s'accumulant ainsi dans l'espace périvitellin (F. Le Naour et al. 2000; Kaji et al. 2000; Miyado, Mekada, et Kobayashi 2000). Ainsi, CD9 apparaît bien être une protéine essentielle de l'adhésion gamétique. En effet, il a depuis été décrit que CD9 intervient dans la création de sites d'adhésion. Ces sites d'adhésion permettent de maintenir les membranes ovocytaire et spermatique suffisamment proches durant toute la durée de l'interaction gamétique. Cette proximité des membranes est nécessaire pour que la fusion des membranes puisse ensuite avoir lieu (Jégou et al. 2011).

Par ailleurs, CD9 joue un rôle dans l'agencement et la structure des microvillosités présentes à la surface de l'ovocyte. Les souris femelles KO *Cd9* ont une plus grande densité de microvillosités, et ces dernières sont plus courtes et plus épaisses, ce qui participerait à expliquer que les spermatozoïdes ne parviennent pas à fusionner avec les ovocytes de ces femelles KO (Runge et al. 2007). Le rôle de CD9 en tant qu'organisateur moléculaire permet également de restreindre la localisation de protéines liées à un complexe glycosylphosphatidylinositol (GPI-AP) afin qu'elles restent au niveau des futurs sites de fusion (Inoue, Saito, et Wada 2020). Bien que CD9 soit essentielle à l'adhésion des gamètes, son rôle d'organisateur se poursuit tout au long de l'interaction gamétique en permettant l'activation de protéines responsables du remodelage du cytosquelette d'actine au niveau des sites d'adhésion du spermatozoïde à l'ovocyte, facilitant ainsi l'intégration de la tête spermatique dans l'ovocyte (H. Wang, Hong, et Kinsey 2021). Chez l'humain, CD9 contrôle les interactions du réseau de tétraspanines, et plus précisément la formation de zones dans lesquelles on retrouve l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ et CD151. Ces zones jouent un rôle essentiel dans la fusion des gamètes (Ziyyat et al. 2006). Par ailleurs, la structure cristallographique de CD9 a été réalisée, permettant ainsi d'étudier plus précisément et de mieux comprendre ses interactions moléculaires et ses fonctions (Figure 12) (Umeda et al. 2020).

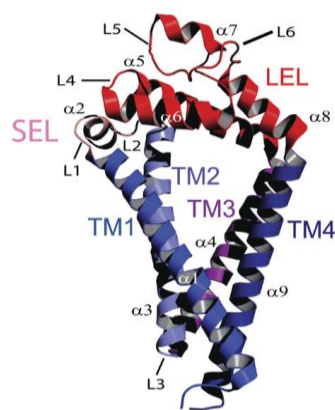


Figure 12 : Structure de la protéine CD9 (de Siu et al. 2021)

II.2. IZUMO1 – JUNO : un couple ligand - récepteur

Avant les années 2020, les deux autres protéines connues comme essentielles à l'interaction gamétique constituent un couple ligand-récepteur. Il s'agit d'IZUMO1 sur la membrane spermatique et JUNO sur la membrane ovocytaire.

A l'origine, IZUMO1 est la toute première protéine à avoir été découverte à la fin des années 80 comme indispensable à la fécondation mais n'a été identifiée qu'en 2005. En effet, ce sont des expériences *in vitro* qui ont montré que l'addition d'un anticorps monoclonal nommé OBF13 induisait une inhibition de la fécondation (Okabe et al. 1988). Cependant, ce n'est qu'en 2005 qu'a pu être identifiée la protéine contre laquelle cet anticorps était dirigé (Inoue et al. 2005). IZUMO1 est une protéine immunoglobuline (Ig)-like de type I et s'exprime spécifiquement dans les cellules germinales. Il a été montré que les mâles KO *Izumo1* étaient stériles. En effet, leurs spermatozoïdes parviennent jusqu'à l'ovocyte, traversent les cellules du cumulus et la zone pellucide mais s'accumulent ensuite dans l'espace périvitellin sans parvenir à fusionner avec la membrane plasmique ovocytaire (Inoue et al. 2005). Ceci a tout d'abord orienté vers un rôle d'IZUMO1 dans l'étape de fusion gamétique puisque les spermatozoïdes qui ont en sont dépourvus continuent à adhérer à l'ovocyte mais sans jamais fusionner avec ce dernier (Inoue et al. 2005). Cependant, il a par la suite été montré qu'IZUMO1 n'est pas suffisante pour induire la fusion puisque des cellules exprimant IZUMO1 ne parviennent pas à fusionner avec des ovocytes alors qu'elles deviennent capables d'y adhérer (Noda et al. 2020; Chalbi et al. 2014). De ce fait, IZUMO1 est suffisante et essentielle pour induire de l'adhésion entre les membranes plasmiques spermatiques et ovocytaire, mais sa seule présence ne permet pas l'induction de la fusion. Le rôle d'IZUMO1 semble donc être de générer des liaisons qui permettent une grande proximité de la membrane spermatique avec la membrane ovocytaire, de façon à induire une adhésion forte entre les gamètes, indispensable pour initier l'étape suivante qui est leur fusion (Chalbi et al. 2014). Récemment, il a été décrit qu'IZUMO1 serait le fusogène responsable de la fusion gamétique chez la souris (Brukman et al. 2022). Ceci a été montré dans un système cellulaire hétérologue dont les lignées cellulaires utilisées pourraient être amenées à fusionner, non pas du fait de l'expression d'IZUMO1, mais du fait d'un autre processus cellulaire tel que l'endocytose ou la trogocytose (Bianchi et Wright 2023). De plus, lorsqu'ils ont placé des cellules exprimant IZUMO1 en présence d'ovocytes de souris, ils ont pu observer de l'adhésion cellulaire mais aucune fusion, ce qui était décrit précédemment dans la littérature (Inoue et al. 2015; Chalbi et al. 2014; Brukman et al. 2022).

Par ailleurs, la localisation d'IZUMO1 sur le spermatozoïde a depuis été décrite. Elle varie selon le statut acrosomal du spermatozoïde. Lorsque les spermatozoïdes sont acrosomes intacts, IZUMO1 est située sur les membranes acrosomales interne et externe dans la région antérieure (dite du capuchon) de l'acrosome. Lors de la réaction acrosomique, IZUMO1 est transloqué sur la membrane plasmique au niveau du segment équatorial qui est la zone par laquelle commence l'interaction entre le spermatozoïde et l'ovocyte (Satouh et al. 2012).

Le récepteur d'IZUMO1 situé sur la membrane ovocytaire a ensuite été recherché en utilisant une banque de clones d'ADNc d'ovocyte de souris. Ces clones ont ensuite été transfectés dans des cellules puis testés pour leur aptitude à se lier à IZUMO1. Ceci a permis d'identifier en 2014 le récepteur ovocytaire d'IZUMO1, JUNO ou IZUMO1R (Bianchi et al. 2014). JUNO est une GPI-AP appartenant à la famille des récepteurs au folate. De la même façon que le phénotype observé pour le KO *Izumo1*, il a été observé que les ovocytes dépourvus de JUNO étaient incapables de lier et de fusionner avec les spermatozoïdes, qui s'accumulaient alors dans l'espace périvitellin. Ceci induit une stérilité des femelles KO *Juno*. Ainsi, ces deux protéines partenaires, que sont IZUMO1 sur le spermatozoïde et JUNO sur l'ovocyte, sont indispensables à l'interaction gamétique et plus particulièrement à l'adhésion des gamètes puisque leurs seules expressions permettent d'observer une adhésion mais pas d'initier la fusion (Chalbi et al. 2014; Noda et al. 2020). Par ailleurs, le rôle de JUNO dans la fécondation humaine a été démontré avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre JUNO (Jean et al. 2019). Celui de IZUMO1 humain a été démontré dans un système hétérologue utilisant des ovocytes de Hamster et des spermatozoïdes humains en présence d'un anticorps anti-IZUMO1 (Inoue et al. 2005).

Depuis, la dynamique de l'interaction entre IZUMO1 et JUNO a été étudiée. Il a été identifié qu'IZUMO1, situé sur le segment équatorial de spermatozoïdes acrosome réagi, se lie à JUNO (Figure 13). Cette interaction permet de rapprocher deux monomères IZUMO1 qui vont alors se dimériser sous l'action de protéines disulfide isomérases (PDI). La dimérisation d'IZUMO1 induirait un changement de conformation de ce dernier, lui faisant alors perdre son affinité pour JUNO entraînant leur détachement. En effet, JUNO n'est alors plus détecté sur la membrane ovocytaire suggérant qu'elle est libérée dans l'espace périvitellin (soit par clivage de sa partie extracellulaire soit sous forme de vésicules) (Inoue et al. 2015). On peut alors se demander quel est le devenir d'IZUMO1 après s'être détaché de JUNO, interagit-il avec un autre acteur ovocytaire ou bien sa dimérisation entraîne-t-elle la mobilisation d'un autre acteur spermatique ?

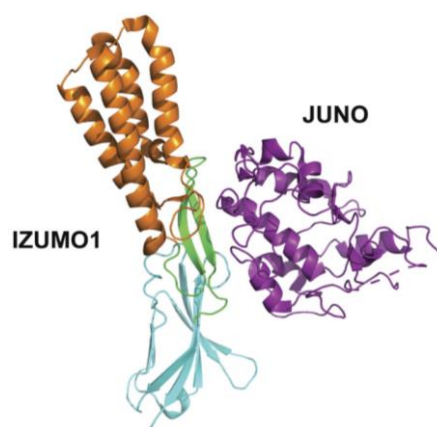


Figure 13 : Structure du complexe IZUMO1-JUNO humain (de Siu et al. 2021)

Ainsi, l'interaction d'IZUMO1 et JUNO est indispensable pour induire l'adhésion des gamètes et plus précisément une adhésion suffisante et efficace qui permet ensuite d'initier la fusion des membranes. Cependant, il apparaît que ce couple ligand-récepteur ne permet pas d'expliquer tout le processus d'adhésion puis de fusion des gamètes. Ce mécanisme semble impliquer des complexes moléculaires composés de multiples protéines.

II.3. Les autres acteurs essentiels à l'interaction gamétique

Plus récemment, six autres protéines ont pu être identifiées comme étant essentielles à la fécondation. Ces protéines sont situées sur le spermatozoïde. Leur caractère essentiel à la fécondation a pu être démontré avec la réalisation de lignées KO pour ces gènes qui ont toutes présentées le même phénotype : les spermatozoïdes dépourvus du gène en question parviennent jusqu'à l'ovocyte et traversent les cellules du cumulus puis la zone pellucide pour venir s'accumuler dans l'espace périvitellin sans qu'il n'y ait de fusion des gamètes (Barbaux et al. 2020; Fujihara et al. 2020; Lamas-Toranzo et al. 2020; Inoue, Hagihara, et Wada 2021; Noda et al. 2020; 2022). De ce fait, les souris mâles de ces lignées sont stériles. SPACA6, FIMP, TMEM95 et DCST1&2 sont des protéines membranaires. SOF1 est quant à elle sécrétée. Certaines de ces protéines présentent des similitudes structurales avec IZUMO1, c'est notamment le cas de SPACA6 et TMEM95. De façon intéressante, dans les KO *Dcst1&2*, *Dcst1*, *Dcst2*, de la même façon que dans le KO *Izumo1*, les spermatozoïdes perdent également l'expression de la protéine SPACA6 (Inoue, Hagihara, et Wada 2021). Ceci suggère que les protéines IZUMO1 et DCST1&2 influencent la présence ou la stabilité de SPACA6. A l'inverse, dans les lignées KO *Spaca6*, *Sof1*, *Tmem95*, *Dcst1&2*, *Dcst1*, *Dcst2*, on n'observe pas de perte d'expression de la protéine IZUMO1 (Noda et al. 2020; Inoue, Hagihara, et Wada 2021). Plusieurs expériences de co-transfection de ces protéines (FIMP, SPACA6, SOF1, TMEM95) en plus d'IZUMO1 ont montré que l'ajout de l'expression de ces protéines n'augmente pas la force d'adhésion obtenue par IZUMO1 seul (Noda et al. 2020; Fujihara et al. 2020). L'ensemble de ces protéines va nécessiter d'autres recherches afin de déterminer précisément leur rôle et leur fonctionnement dans la dynamique de la fécondation.

Dernièrement, en 2022 et 2023, deux autres protéines ont été découvertes qui interviendraient dans l'adhésion/fusion gamétique. La première, Fc receptor-like 3 ou MAIA, est ovocytaire et serait membre d'un complexe protéique IZUMO1/JUNO/MAIA. Les auteurs proposent un modèle dans lequel la dimérisation d'IZUMO1 engendrerait la translocation de JUNO depuis la membrane ovocytaire vers la membrane plasmique du spermatozoïde, laissant alors sa place à MAIA qui interagirait alors avec IZUMO1. Enfin, cette interaction engendrerait un changement de conformation de MAIA qui permettrait de rapprocher les membranes spermatique et ovocytaire à travers cette liaison IZUMO1/MAIA (Vondrakova et al. 2022). Il n'existe cependant pas d'orthologue de ce gène chez la souris. La seconde protéine décrite

plus récemment, est TMEM81. C'est une protéine spermatique qui interviendrait dans un complexe protéique composé de SPACA6/IZUMO1/TMEM81. Tout comme IZUMO1 et SPACA6, TMEM81 serait essentiel à l'adhésion gamétique. Les KO *Tmem81* réalisés chez la souris et le zebrafish ont montré une infertilité des mâles. TMEM81 serait un facteur spermatique essentiel à l'interaction gamétique (Deneke et al. 2023).

Ainsi, toutes les protéines décrites ci-dessus sont essentielles à la fécondation et il apparaît de plus en plus que l'interaction gamétique est un processus composé de plusieurs étapes au cours desquelles interviennent plusieurs complexes moléculaires, chacun composé de multiples protéines, dont certaines ne sont pas encore identifiées (Figure 14).

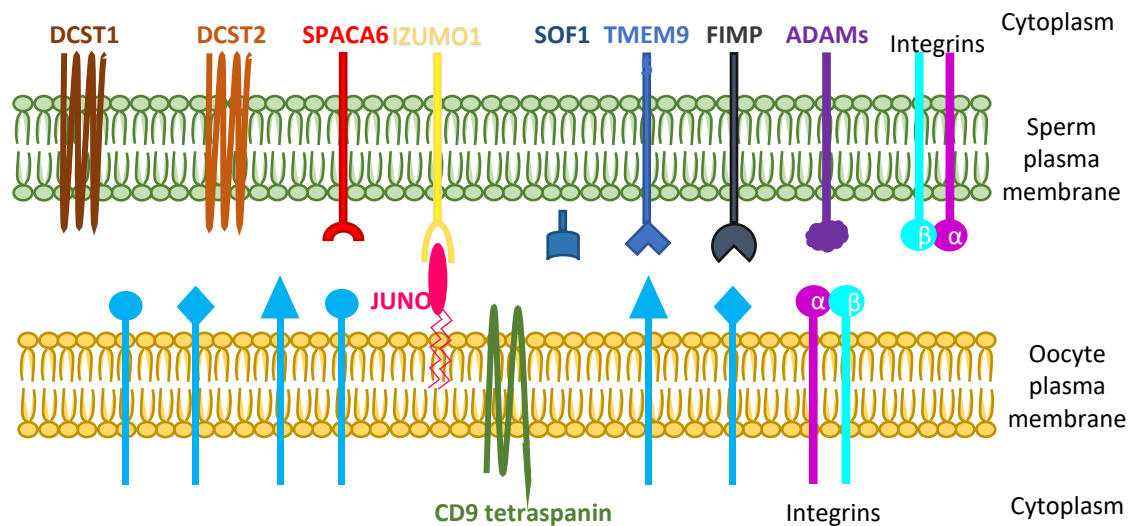


Figure 14 : Schéma des protéines essentielles de l'interaction gamétique

II.4. Une protéine de fusion ?

A ce jour, la fusion gamétique reste encore un processus dont le mécanisme moléculaire n'est pas connu. En effet, aucune des protéines décrites précédemment n'est suffisante pour initier la fusion des gamètes.

En prenant exemple sur d'autres processus physiologiques de fusion cellulaire, comme la formation du placenta, la myogenèse ou l'entrée de virus dans les cellules, plusieurs scénarii permettant d'expliquer la fusion des gamètes peuvent être imaginés. La fusion cellulaire serait constituée de différentes étapes : l'adhésion et le rapprochement des membranes des gamètes, puis une hémifusion (les feuillettes externes des membranes plasmiques des deux

cellules concernées fusionnent) et enfin la formation d'un pore de fusion qui dans un second temps s'étend entraînant la fusion des cytoplasmes (Deneke et Pauli 2021).

L'un des scénarii envisagés serait l'existence d'une protéine fusogène. Une protéine fusogène est une protéine qui porte un domaine fusogène, dont la présence sur l'une des cellules ou les deux, serait suffisante pour induire la fusion des cellules. Dans ce scénario, la famille des protéines ADAM (A Disinterin And Metalloprotease) a souvent été évoqué. En effet, ces protéines présentent des domaines qui leur permettent d'avoir un rôle dans l'adhésion cellulaire. D'autre part, certaines de ces protéines présentent dans leur séquence un peptide fusogène putatif. Enfin, l'un des groupes de classification des ADAMs regroupe les ADAMs qui s'expriment spécifiquement dans le testicule.

L'autre scénario serait les réarrangements des membranes lipidiques. La proximité des membranes des deux cellules serait suivie d'une étape d'hémifusion au cours de laquelle seuls les feuillettes externes des membranes plasmiques fusionneraient. Durant cette étape, seuls les lipides membranaires des deux cellules fusionneraient mais pas les contenus cellulaires. Seulement après cette étape se produirait la fusion des feuillettes internes des membranes plasmiques, induisant alors la formation d'un pore de fusion qui permettrait alors la fusion des contenus cellulaires.

D'autres facteurs pourraient également être impliqués dans la fusion gamétique. En effet, la présence de microdomaines membranaires, constitués de radeaux lipidiques, au sein desquels les protéines essentielles à l'adhésion et/ou fusion seraient regroupées ensemble, constitueraient des zones d'adhésion/fusion préférentielles. Il a également été montré que la phosphatidylsérine, normalement située sur le feuillet interne de la membrane plasmique, se retrouve exposée sur le feuillet externe dans certaines conditions et notamment lors de processus de fusion cellulaires (myogenèse, formation de placenta, ...) (Jeong et Conboy 2011; Zhang et al. 2020). Il semblerait que ce même phénomène se produise durant la fusion gamétique (Rival et al. 2019). Enfin, le remaniement du cytosquelette d'actine au niveau du site d'adhésion entre le spermatozoïde et l'ovocyte pourrait également participer à l'initiation de la fusion gamétique et à l'inclusion de la tête spermatique dans l'ovocyte (H. Wang, Hong, et Kinsey 2021).

Ainsi, bien que des avancées aient été faites dans la connaissance du processus d'interaction gamétique, il reste encore des inconnues : l'ensemble des membres participant aux complexes protéiques nécessaires à l'adhésion gamétique, et la compréhension du mécanisme moléculaire de la fusion des gamètes.

II.5. La famille des ADAMs, protéines de l'interaction gamétique ?

La famille des protéines ADAMs pour A Disintegrin And Metalloprotease est une grande famille protéique codée par 33 gènes chez la souris⁴ et 27 chez l'Humain⁵ (dont 7 sont des pseudogènes). Cette famille protéique est constituée de protéines transmembranaires composées des domaines suivants : un pro-domaine, un domaine métalloprotéinase, un domaine désintégrine (-like), un domaine enrichi en cystéines, un domaine EGF-like (Epidermal Growth Factor), un domaine transmembranaire et enfin une queue cytosolique (Figure 15) (Giebeler et Zigrino 2016).

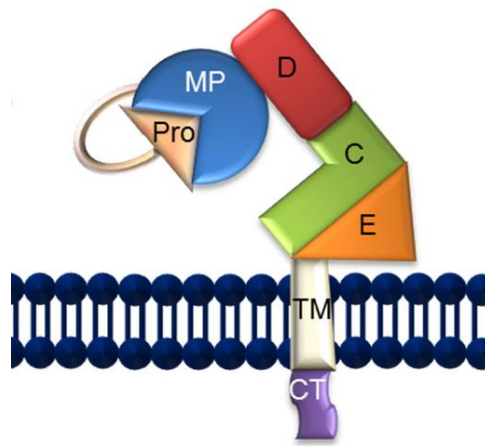


Figure 15 : Schéma de la structure générale des protéines de la famille ADAM (de Giebeler et Zigrino, 2016)

De par ces différents domaines, les activités de cette famille protéique sont multiples. Le pro-domaine permet de maintenir latente l'activité protéolytique des ADAMs par un mécanisme cystéine-switch. Par leur domaine métalloprotéase, actif chez seulement la moitié des ADAMs (celles qui possèdent le site de liaison au Zinc (Zn) dans leur domaine métalloprotéase), la famille des ADAMs participe à l'interaction cellule-cellule en jouant un rôle protéolytique. En effet, cette activité protéolytique permet la libération d'ectodomains de protéines voisines (de la même cellule ou d'une cellule adjacente) ou de composants de la matrice extra-cellulaire. Le domaine désintégrine-like joue un rôle dans l'adhésion aux intégrines (Edwards, Handsley, et Pennington 2008).

En plus de réguler l'activité protéase des ADAMs, le domaine enrichi en cystéines participe également à la liaison aux intégrines (Tableau 1). En effet, le domaine désintégrine, en association avec le domaine enrichi en cystéines, permet aux ADAMs de participer à la régulation des interactions cellulaires en se liant aux intégrines et aux protéoglycanes

⁴ D'après <https://www.informatics.jax.org> (MGI – Mouse Genome Informatics)

⁵ D'après <https://www.genenames.org> (HGNC – HUGO Gene Nomenclature Committee)

héparansulfates. Enfin, les ADAMs jouent un rôle dans la signalisation cellulaire via leur queue cytoplasmique (Edwards, Handsley, et Pennington 2008; Reiss et Saftig 2009; Giebeler et Zigrino 2016; Klein et Bischoff 2011).

Table 4
ADAM-Integrin associations

	$\alpha 2\beta 1$	$\alpha 4\beta 1$	A4 $\beta 7$	$\alpha 5\beta 1$	$\alpha 6\beta 1$	$\alpha 6\beta 4$	$\alpha 9\beta 1$	$\alpha V\beta 3$	$\alpha V\beta 5$
ADAM1							•		
ADAM2		•			•		•		
ADAM3		•			•		•		
ADAM7		•	•				•		
ADAM9	•				•	•	•		•
ADAM12		•					•		
ADAM15				•			•	•	
ADAM17				•			•		
ADAM19		•		•			•		
ADAM23								•	
ADAM28		•	•				•		
ADAM33		•		•			•		

• Indicates an association has been reported.
ADAM-Integrin interactions, adapted from Arribas et al. (2006).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des interactions connues entre les protéines ADAM avec les intégrines (*de Edwards et al, 2008*)

Chez la souris, dans la famille des ADAMs, plus de la moitié des protéines s'expriment spécifiquement ou de façon majoritaire dans les tissus de l'appareil reproducteur mâle et notamment dans le testicule et dans l'épididyme. Ce profil d'expression suggère que ces protéines pourraient jouer un rôle dans la spermatogenèse et plus largement dans les fonctions reproductrices mâles (Reiss et Saftig 2009; Y. Chen et al. 2021). Les protéines ADAMs exprimées dans les tissus de l'appareil reproducteur mâle sont divisées en 3 groupes du fait de leur structure génique. Le groupe I est composé des ADAMs 1, 4, 6, 20, 21, 24, 25, 26, 29, 30, 34 et 39. Ce groupe est caractérisé par des gènes dont la séquence codante ne contient aucun intron. ADAM 2, 3, 5, 18 (aussi appelé ADAM27) et 32 appartiennent au groupe II. Dans le groupe II, les gènes sont composés de plusieurs petits exons, occupant de grandes régions du génome (Yi et al. 2010; Y. Chen et al. 2021). Enfin, dans le groupe III on retrouve ADAM 7 et 28 (Lee, Hong, et Cho 2020; Y. Chen et al. 2021). Le groupe III est constitué de gènes exprimés majoritairement dans l'épididyme et dont l'expression est régulée par des facteurs testiculaires ou androgéniques (T. Kim et al. 2006).

Chez l'humain, parmi les ADAMs exprimées dans le système reproducteur mâle, les ADAMs 2, 7, 18, 29 et 32 n'ont pas d'activité protéase. A l'inverse, ADAM 20, 21 et 30 ont dans leur séquence le site actif caractéristique de type reprotlysine (HEXGHXXGXXHD) leur permettant d'être une protéase fonctionnelle (Edwards, Handsley, et Pennington 2008). Enfin, certaines protéines de la famille ADAM possèdent dans leur séquence un peptide de fusion putatif. Ces peptides fusogènes présentent des caractéristiques communes avec les peptides de fusion retrouvés chez certains virus. Ce sont de petits peptides (une vingtaine d'acides aminés) situés dans une sous-unité extracellulaire ancrée à la membrane et capables de former des hélices α amphipathiques avec des côtés hydrophiles et hydrophobes, souvent interrompus par une ou deux prolines centrales. On retrouve ces peptides fusogènes putatifs

dans les séquences des ADAMs 1, 9, 11, 12, 20, 21, 25 et 39, au niveau de leur domaine enrichi en cystéines (Huovila, Almeida, et White 1996; van Huijsduijnen 1998, 20). Cependant, à ce jour, la propriété fusogénique d'aucune de ces ADAMs n'a pu être démontrée. ADAM12 joue bien un rôle dans des processus de fusion cellulaire (myogenèse, adipogenèse, fusion des trophoblastes, fusion des ostéoclastes) mais cela n'implique pas son peptide fusogène mais plutôt ses activités de signalisation intracellulaire ou métalloprotéase (Yagami-Hiromasa et al. 1995; Kang, Cao, et Zolkiewska 2000; Kurisaki et al. 2003; Verrier et al. 2004; Aghababaei et al. 2015).

Par ailleurs, plusieurs protéines des trois groupes d'ADAMs cités précédemment sont impliquées dans le processus de reproduction. En effet, la génération de KO de ces protéines a permis d'élucider le rôle de certaines de ces ADAMs. Ainsi, les mâles KO *Adam1a*, *Adam2* et *Adam3* sont infertiles suite à un défaut de migration des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles (Shamsadin et al. 1999; Nishimura et al. 2001; 2004). En effet, il a été montré que la formation de complexes hétérodimères ADAM1a-ADAM2 est essentielle au transport d'ADAM3 à la membrane des spermatozoïdes et que la présence d'ADAM3 à la membrane spermatique est indispensable à la migration des spermatozoïdes depuis l'utérus jusqu'à l'oviducte et à leur liaison à la zone pellucide (Nishimura et al. 2004; Yamaguchi et al. 2009; Han et al. 2010). De plus, l'étude de ces KO a permis de montrer que les niveaux d'expression d'autres ADAMs étaient affectés par l'absence de ces protéines. ADAM6, qui forme des hétérodimères avec ADAM2 et ADAM3, ainsi qu'ADAM4 ont des niveaux d'expression significativement diminués dans les KO *Adam2* et *Adam3*. Ainsi, ADAM4 et ADAM6 en participant à ces complexes protéiques pourraient elles aussi jouer un rôle dans la formation de spermatozoïdes matures et fonctionnels (Han et al. 2009). De la même façon, ADAM7, dont l'expression est épидидymaire, joue un rôle important dans les fonctions de reproduction mâles en maintenant l'intégrité de l'épididyme et en étant nécessaire pour le bon niveau d'expression de certaines protéines spermatiques exprimées à la membrane comme ADAM2. Les spermatozoïdes KO *Adam7* ont une morphologie flagellaire altérée ainsi qu'une mobilité réduite (H. Choi et al. 2015). Enfin, *Adam24* jouerait un rôle dans la fécondation en participant au blocage à la polyspermie (Zhu et al. 2009). A l'inverse, certains mâles KO *Adam* présentent une fertilité normale. Ainsi, les gènes *Adam21* et *Adam32* ne sont pas indispensables à la physiologie de la reproduction (Lee, Hong, et Cho 2020; Y. Chen et al. 2021).

La fécondation est donc un processus extrêmement complexe, constitué de nombreuses étapes depuis la migration des gamètes jusqu'à leur fusion. Cependant, il reste encore de nombreuses inconnues pour pouvoir décrire parfaitement l'ensemble du processus dans son entièreté. A chaque étape de ce processus complexe, une altération peut survenir. Comblé le manque de connaissance sur le mécanisme de l'interaction gamétique pourrait permettre d'identifier les causes de certaines infertilités, et peut être d'identifier de nouvelles cibles potentielles dans le but d'une contraception.

III. Les défauts de fertilité : Origines possibles et conséquences

La fertilité masculine est soumise à la réussite de nombreuses étapes. En effet, une altération peut survenir à chacun des niveaux : lors du maintien des cellules souches, lors des étapes de la spermatogenèse, lors de la maturation des spermatozoïdes et de leur migration ou de l'étape finale de la fécondation qui est l'adhésion puis la fusion des gamètes. Des altérations dans l'une ou l'autre étape peuvent avoir des conséquences directes et entraîner l'arrêt du mécanisme à l'étape en question, ou bien le processus se poursuit et les conséquences peuvent ne devenir visibles qu'à la toute fin de la fécondation, à savoir lors de l'interaction gamétique.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à deux types d'infertilité rares, chacune due à des dysfonctionnements de deux structures spécifiques du spermatozoïde : l'acrosome avec la globozoospermie et le flagelle avec les anomalies morphologiques multiples du flagelle.

III.1. Anomalie de l'acrosome : La globozoospermie

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à une tératozoospermie (altération morphologique des spermatozoïdes) appelée globozoospermie. Cette pathologie, qui touche 0,1% des hommes infertiles (Modarres, Tavalae, et Ghaedi 2019), est caractérisée par des spermatozoïdes présentant une tête ronde ainsi qu'une anomalie de l'acrosome (Figure 16). Deux types de globozoospermies sont différenciés. Toutes deux sont définies par la présence de spermatozoïdes à tête ronde mais l'absence totale ou partielle de l'acrosome les distingue l'une de l'autre. En effet, la globozoospermie de type I est caractérisée par l'absence totale d'acrosome, alors que celle de type II est définie par une absence partielle de l'acrosome. Dans la globozoospermie de type II, on observe un bourgeon acrosomal.

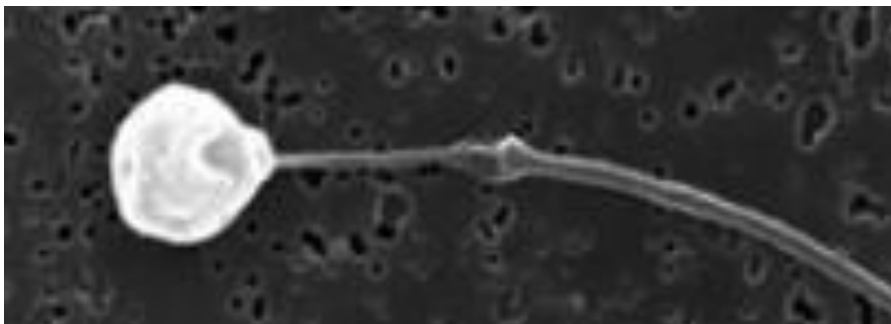


Figure 16 : Spermatozoïde humain avec une tête spermatique ronde d'un patient atteint de globozoospermie observé en microscopie électronique (de Beurois et al. 2020)

A ce jour, quelques gènes impliqués dans la globozoospermie ont été identifiés. En effet, les modèles de souris KO ont permis de caractériser des gènes en cause dans cette pathologie. Ces gènes participent à la biogenèse de l'acrosome. En effet, on retrouve des gènes (Figure 17) :

- du réticulum endoplasmique : *Gba2*, *Hsp19b1*, *Fads2*, ...
- de l'appareil de Golgi : *Tmf1*, *Gm130*, *Golga3*, *Nhe8*, ...
- du réseau cis et trans-golgi : *Smap2*, *Gmap210*, *Gopc*, *Pick1*, ...
- de la granule proacrosomale : *Agfg1*, ...
- de la vésicule et de la matrice acrosomale : *Spink2*, *Zpbp1/2*, *Spaca1* ...
- de l'acrosome : *Acrbp*, *Pcsk4*, ...
- du cytosquelette : *Hipk4*, *Hook1*, ...
- de la manchette : *Sun3/4*, *Fused*, *Spag17*, ...

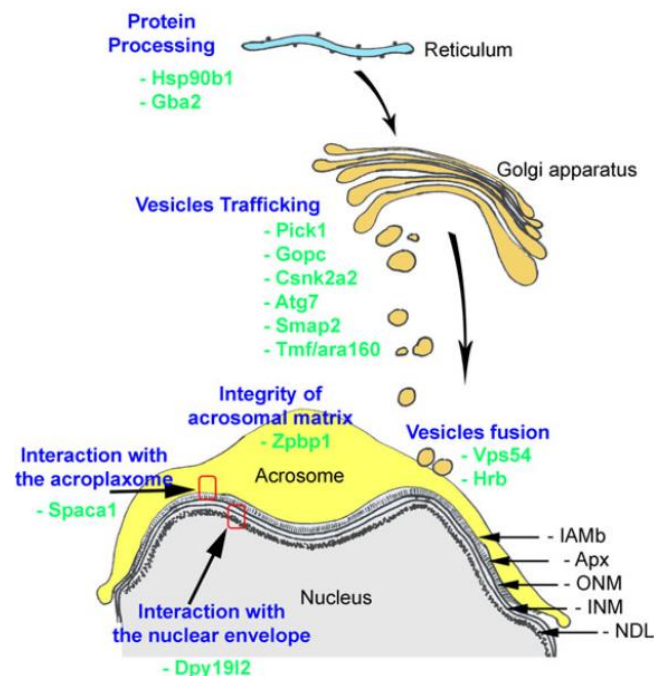


Figure 17 : Représentation schématique de la biogenèse de l'acrosome (de Coutton et al. 2015) Représentation de la localisation des protéines impliquées dans la biogenèse de l'acrosome dont l'inactivation chez les modèles souris entraîne l'apparition d'un phénotype de globozoospermie.

Parmi les modèles KO de ces gènes, les mâles présentent une fertilité altérée (Coutton et al. 2015; Xiong, Shen, et Wang 2021) . Par ailleurs, d'autres anomalies des spermatozoïdes globozoospermiques ont pu être observées. En effet, bien que ce soient les anomalies de l'acrosome qui définissent la globozoospermie, les spermatozoïdes de ces modèles KO présentent d'autres altérations. Ainsi, on peut retrouver des défauts de l'enveloppe nucléaire, de l'assemblage de la pièce intermédiaire du flagelle, de la manchette, ainsi qu'une diminution de la mobilité des spermatozoïdes comme conséquence (Bizkarguenaga et al. 2019; Xiong,

Shen, et Wang 2021). Les spermatozoïdes dont la morphologie est altérée peuvent également présenter une chromatine insuffisamment condensée ainsi qu'une fragmentation d'ADN plus importante (Yassine et al. 2015).

D'après une étude récente, 87 modèles de souris KO présentent un phénotype de globozoospermie, parmi eux, seulement 9 des gènes décrits ont été retrouvés mutés ou délétés chez des patients globozoospermiques (Moreno 2023). Ces gènes sont *DPY19L2*, *SPATA 16*, *PICK1*, *SPACA 1*, *C2CD6*, *ZPBP 1*, *CCDC62*, *CCIN*, *TSC22D4-C7ORF61* (Beurois et al. 2020; Moreno 2023; Crafa et al. 2023). Par ailleurs, deux autres gènes sont décrits comme étant associés à la globozoospermie chez l'humain : *DNAH17*, *GGN* (Celse et al. 2021). Plus récemment, des mutations du gène *SPATA20* ont été identifiées chez des patients globozoospermiques (X. Wang et al. 2023; Martinez, Metzler-Guillemain, et al. 2023). Parmi ces gènes, cinq principaux ont pu être identifiés comme étant responsables de cette anomalie morphologique des spermatozoïdes dans le cadre de l'étude de patients globozoospermiques : *DPY19L2*, *ZPBP1*, *SPATA16*, *PICK1* et *CCDC62*. Il a notamment été décrit qu'une anomalie dans le gène *DPY19L2* serait responsable de 60 à 80% des cas de globozoospermie (Ray et al. 2017; Beurois et al. 2020). *DPY19L2* est une protéine de la membrane nucléaire interne qui permet l'ancrage de l'acrosome au noyau à travers l'acroplaxome. Sa mutation entraîne le détachement de l'acrosome. La mutation de *ZPBP1*, qui est une protéine de la membrane acrosomale, représente ~ 4 % des cas de patients globozoospermiques. Néanmoins, une certaine proportion des cas de globozoospermie chez l'Homme reste encore à ce jour sans cause identifiée (~ 20 à 40 %) (Beurois et al. 2020). Ceci indique qu'il pourrait exister d'autres gènes impliqués dans cette pathologie.

III.2. Anomalies du flagelle : Anomalies Morphologiques Multiples du Flagelle

Les anomalies morphologiques multiples du flagelle (Multiple Morphological Anomalies of the flagella – MMAF) sont définies comme une asthénotérazoospermie. En effet, les MMAF affectent la morphologie du flagelle (térazo) en association avec une baisse de la mobilité des spermatozoïdes (asthéné). Les MMAF sont caractérisées par différentes anomalies morphologiques du flagelle comme des flagelles courbés, enroulés, courts, d'épaisseurs irrégulières voire absents, ce qui induit forcément des problèmes de mobilité des spermatozoïdes (Figure 18) (Ben Khelifa et al. 2014). Les MMAF sont dues à des anomalies des structures axonémales et périaxonémales (Coutton et al. 2015).

Ces anomalies morphologiques peuvent, pour certaines d'entre elles, être visibles en microscopie optique, mais la microscopie électronique est la seule à permettre d'identifier et de caractériser en détail les structures flagellaires affectées (Figure 19) (Escalier et Touré 2012). De façon générale, la malformation d'une structure flagellaire entraîne des altérations des autres structures flagellaires (Escalier et Touré 2012).

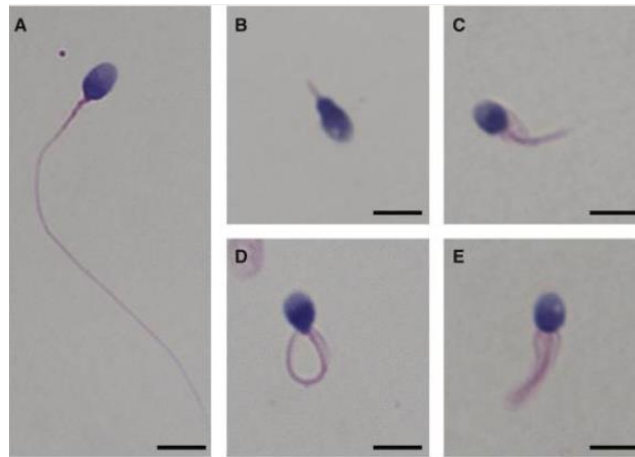


Figure 18 : Morphologies de spermatozoïdes observés en microscopie optique d'individu contrôlé (A) et de patients atteints de MMAF (B-E) (de *Liu et al 2020*).
 B : flagelle absent ; C : flagelle court ; D : flagelle enroulé ; E : flagelle de diamètre irrégulier

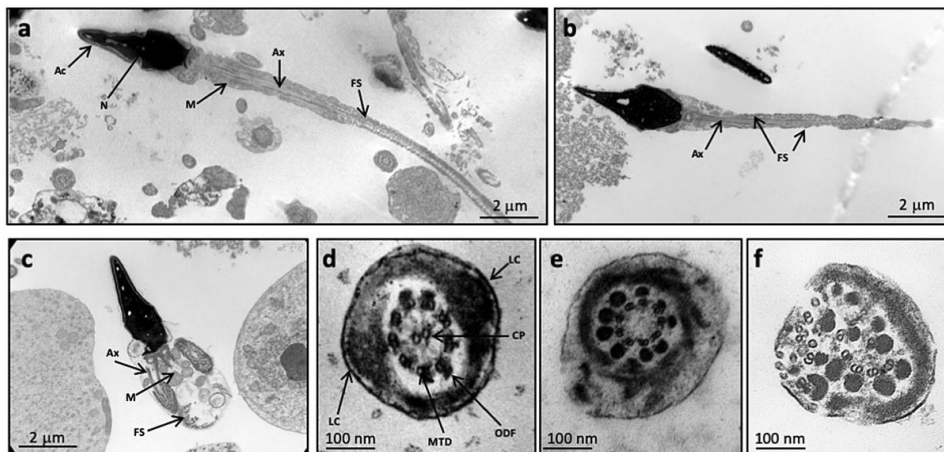


Figure 19 : Analyse ultrastructurale de spermatozoïdes observés en microscopie électronique d'un individu contrôlé (a et d) et de patients atteints de MMAF (b-c et e-f) (de *Touré et al 2021*).
 b : flagelle court ; c : présence d'un sac cytoplasmique à la place du flagelle ; e-f : absence de la paire centrale de microtubules de l'axonème, et désorganisation des autres structures

Du fait de la composition du flagelle, similaire à celle des cils motiles, les dyskinésies ciliaires primaires induisant des malformations de l'axonème des cils de l'appareil respiratoire, peuvent être responsables d'anomalies de la morphologie du flagelle et donc d'infertilité masculine. Cette pathologie affecte la structure commune aux cils motiles et aux flagelles qui est l'axonème. Cependant, les flagelles des spermatozoïdes des patients présentant une dyskinésie ciliaire primaire peuvent apparaître morphologiquement normaux mais cet aspect n'est pas toujours exploré chez ces patients (Coutton et al. 2015). Il est également possible que des patients atteints de dyskinésies ciliaires primaires ne présentent pas d'asthénozoospermie (Ben Khelifa et al. 2014). Parmi les mutations des gènes induisant une dyskinésie ciliaire primaire associée à une asthénozoospermie, on retrouve notamment

CCDC39, *DNAAF2*, *DNAH5*, *DYX1CI*, *HYDIN*, *LRR6* (Coutton et al. 2015). Par exemple, une mutation dans le gène *CCDC39* engendre l'absence des bras internes de dynéine, ce qui affecte à la fois les axonèmes des cils et des flagelles (Merveille et al. 2011). De la même façon, une mutation du gène *DNAAF2* engendre l'absence des deux bras de dynéine (interne et externe) induisant alors des malformations dans les différents types d'axonème (Omran et al. 2008). Récemment, ce sont des mutations du gène *CCDC65*, auparavant associées aux dyskinésies ciliaires primaires, qui ont été décrites chez deux patients présentant des anomalies morphologiques des flagelles de leurs spermatozoïdes (Jreijiri et al. 2023).

Néanmoins, les MMAF se distinguent des autres asthénozoospermies. En effet, les MMAF sont désormais considérées comme un type particulier d'asthénotératozoospermie à distinguer des autres asthénozoospermies comme celles engendrées par la malformation de la gaine mitochondriale, les anomalies liées aux dyskinésies ciliaires primaires, la malformation de l'annulus et les anomalies des canaux ioniques (W.-L. Wang, Tu, et Tan 2020; Touré et al. 2021). Les MMAF peuvent être dues à des mutations des gènes impliqués dans différentes structures flagellaires ou des gènes nécessaires à la mise en place du flagelle. Ainsi, il est possible de classer l'origine des MMAF suivant les gènes codant des protéines impliquées dans (Touré et al. 2021) :

- Les bras de dynéines interne et externe et leurs complexes : *DNAH1*, *DNAH2*, *DNAH6*, *CFAP43*, *CFAP44*, ...
- Les complexes des ponts radiaires : *CFAP251*
- La gaine fibreuse : *AKAP3*, *AKAP4*, *FSIP2*
- Le centrosome : *CEP135*
- Le transport intra-flagellaire : *TTC21A*, *TTC29*, *SPEF2*, *CFAP69*
- Les complexes de dégradation protéique : *QRICH2*
- Protéines de localisation inconnue : *AK7*, *ARMC2*, ...

DNAH1 (Dynein axonemal heavy chain 1) est le premier gène causant des MMAF lorsqu'il est muté à avoir été décrit (Ben Khelifa et al. 2014). *DNAH1* est une composante des bras de dynéines internes. Sa mutation entraîne une importante désorganisation de l'axonème, des anomalies des doublets de microtubules périphériques, et l'absence de la paire centrale de microtubules et des bras de dynéines internes (Ben Khelifa et al. 2014; Martinez, Barbotin, et al. 2023). Récemment, une mutation du gène *ZMYND12* a été associée à des MMAF avec présence de spermatozoïdes avec des flagelles courts, enroulés ou d'épaisseurs irrégulières (Dacheux et al. 2023). Il a été montré que *ZMYND12* est une protéine axonémale qui appartient au même complexe que *DNAH1*, et qui a une fonction importante dans l'organisation du flagelle. Enfin, les mutations de certaines protéines nécessaires à la bonne formation du flagelle peuvent mener à une altération des transports intra-flagellaires et/ou intra-manchette engendrant alors des phénotypes MMAF associés à une altération de la forme de la tête spermatique. C'est notamment le cas pour les gènes *SPEF2* et *CFAP43* (Mari S. Lehti et al. 2017; Yu et al. 2021).

III.3. Anomalies de l'interaction gamétique

Aucun cas clinique avéré de défaut de l'interaction gamétique n'a jusqu'alors été décrit. En effet, certains gènes ont été identifiés comme étant essentiels à l'interaction gamétique chez la souris dans le cadre de modèle KO et non de mutations spontanées. De plus, aucun de ces gènes essentiels n'a été retrouvé muté chez des patients infertiles. Ceci s'explique par l'impossibilité de pouvoir observer ces anomalies d'interaction gamétique. En effet, certains outils nous permettent d'observer les altérations morphologiques des spermatozoïdes (microscopie optique ou électronique) ou encore les altérations de concentration ou de mobilité des spermatozoïdes (CASA). Il s'agit donc de critères objectifs, mesurables et observables. Cependant, concernant l'interaction gamétique on ne peut qu'observer si l'adhésion puis la fusion se produisent ou non puisque les spermatozoïdes semblent normaux en apparence. En effet, dans les différents KO des gènes essentiels à l'interaction gamétique décrits chez la souris, leurs spermatozoïdes sont normaux en termes de morphologie, de concentration et de mobilité mais aucune fécondation n'est obtenue bien qu'ils paraissent normaux en apparence. Pour découvrir des cas humains équivalents, il faudrait que les patients subissent une fécondation *in vitro* et qu'un phénotype d'accumulation de spermatozoïdes dans l'espace périvitellin soit recherché ou observé en routine. L'absence de fécondation entraîne assez systématiquement le passage à l'étape d'ICSI qui court-circuite l'interaction gamétique. En effet, plus de 60 % des fécondations réalisées en France dans les centres d'assistance médicales à la procréation se font par ICSI (« Agence de la biomédecine » 2021).

Néanmoins, en 2018, la cas d'un patient infertile a été rapporté (Sha et al. 2018). Ses spermatozoïdes s'accumulaient dans l'espace périvitellin sans parvenir à fusionner avec l'ovocyte. Une mutation du gène *ADAM20* a pu être identifiée. Il s'agit donc du premier article qui pourrait correspondre à l'identification d'une mutation altérant l'interaction gamétique. Ceci a été le point de départ d'une partie de mes travaux de thèse que je développerai dans la troisième partie de mon manuscrit.

Partie 2 : De l'étude phénotypique à l'identification de gènes impliqués dans la spermatogenèse

I. Contexte de l'étude menée : L'établissement des lignées de souris IRCS

Dans le cadre d'une étude réalisée par l'Institut Pasteur (Paris, France), plusieurs lignées de souris recombinantes congéniques interspécifiques (Interspecific Recombinant Congenic Strain – IRCS) ont été créées (Burgio et al. 2007). Une lignée IRCS est une lignée produite par le croisement initial de souris d'espèces différentes. Après des croisements de type rétrocroisements (backcross) et croisements frères/sœurs, plusieurs lignées IRCS sont ainsi produites. Le but de ces croisements est d'obtenir des lignées qui présenteront un fond génétique d'une espèce et un fragment de génome issu de l'autre espèce. Ainsi, les lignées IRCS ne présentent pas de perte d'information génétique, mais localement une autre version du génome et donc un polymorphisme phénotypique et génotypique très important. Cette approche permet d'étudier l'influence d'un fragment de génome d'une espèce présent dans le fond génétique d'une autre espèce. Ainsi, l'étude d'une lignée va permettre de rechercher l'apparition d'un phénotype différent du phénotype de la lignée dont le fond génétique est issu. Si un tel phénotype est observé, alors cela indique que la présence localement d'un fragment de génome d'une autre espèce influence et modifie le phénotype d'origine de cette lignée.

Ici, lors de l'étude menée au sein de l'Institut Pasteur, les lignées IRCS produites étaient le résultat du croisement initial entre des souris *Mus musculus domesticus* C57BL6/J (B6) et *Mus spretus* SEG/Pas (SEG). Les lignées obtenues présentaient un fond génétique B6, correspondant en moyenne à ~98,7% de leur génome, et un ou plusieurs fragment(s) de génome d'espèce SEG, soit ~1,3% de leur génome. Plusieurs dizaines de lignées différentes ont été produites. Elles ont été extensivement phénotypées sur de nombreux critères impliquant des fonctions diverses (hématologie, développement, reproduction...).

L'étude de ces lignées a permis de mettre en évidence chez certaines d'entre elles une hypofertilité. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la lignée RC3. Il a été observé que le nombre d'embryons implantés était significativement diminué dans les croisements impliquant cette lignée et plus particulièrement ceux issus de mâles RC3 (Cf. Article N°1 – Figure 3). Cette hypofertilité des mâles RC3 *in vivo*, a pu être confirmée *in vitro* avec la réalisation de fécondations *in vitro* (FIV). En effet, l'index de fécondation était diminué lorsque le sperme des mâles RC3 était utilisé (Cf. Article N°1 – Figure 4). Pour déterminer la cause de cette hypofertilité, les paramètres spermatiques ont été évalués. La concentration de spermatozoïdes des mâles B6 et des mâles RC3 était comparable, mais la mobilité et notamment la mobilité progressive apparaissait diminuée dans le groupe RC3. Par ailleurs, des marquages des spermatozoïdes ont permis d'observer que les spermatozoïdes des mâles RC3 perdaient leur acrosome prématurément. Ceci peut s'expliquer par une altération ou une

instabilité au niveau de l'acrosome, entraînant une réaction acrosomique spontanée précoce. Afin d'affiner nos observations, nous avons analysé les spermatozoïdes en microscopie électronique. Ceci nous a permis d'observer un décollement partiel de l'acrosome (Cf. Article N°1 – Figure 6). Ceci suggère un défaut d'attachement de l'acrosome à l'acroplaxome. De plus, d'autres altérations ont pu être observées en microscopie électronique comme la persistance de résidus cytoplasmique le long du flagelle, contenant notamment des gouttelettes lipidiques (Cf. Article N°1 – Figure 6). Ces éléments nous ont permis de décrire ce phénotype comme celui d'une globozoospermie partielle.

A partir de l'analyse génomique de la lignée RC3 par des microsatellites et des polymorphismes d'un seul nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism - SNP), ainsi qu'en comparant avec des lignées présentant des fragments SEG similaires, nous avons borné précisément le fragment unique du génome SEG porté par la lignée RC3 dans le fond génétique B6. Ce fragment, situé sur le chromosome 1, contient des gènes de version *Spretus* qui dans le fond génétique B6 induisent un phénotype de globozoospermie partielle. Nous avons appelé cette région du chromosome 1 *Mafq1* pour Male fertility QTL (Quantitative Trait Locus) chromosome 1. Ce QTL est responsable de la globozoospermie partielle observée chez la lignée RC3.

L'intervalle *Mafq1*, long de ~4,2Mb, comprend selon la base de données Ensembl des gènes codants (n=71), des transcrits processés (n=37), des pseudogènes (n=50) et des ARNs non codants (n=48). Nous avons décidé de procéder à une approche de recherche de gène candidat pour identifier le (ou les) gène(s) responsable(s) de l'apparition du phénotype observé. Dans un premier temps, nous avons réduit le nombre de candidats potentiels puis, dans un second temps, nous avons classé ces candidats par ordre d'intérêt. Enfin, nous souhaitons tester notre hypothèse en réalisant le KO du meilleur gène candidat et étudier si le phénotype obtenu avec ce KO est identique ou ressemblant au phénotype des RC3.

Différentes approches permettent d'exclure de notre recherche un certain nombre de gènes présents dans l'intervalle. En effet, l'étude bibliographique ainsi que celle des bases de données (Mouse Genome Informatics⁶) permet d'éliminer de cette liste les gènes dont le KO a déjà été réalisé et qui ne présentent pas d'altération de la fertilité ou de la reproduction. L'exploration de la littérature nous a également permis d'exclure les gènes dont la fonction avait été décrite et n'était pas en lien avec le phénotype des RC3. L'étude des bases de données (The Human Protein Atlas⁷, BioGPS⁸) permet également de connaître le profil d'expression de ces gènes et de ne pas tenir compte des gènes qui ne s'expriment pas dans les tissu ou cellule étudiés, ici le testicule et les cellules germinales mâles. Enfin, l'analyse des différences existantes entre les versions des génomes *Spretus* et B6 permet d'affiner la liste des gènes pouvant être mis en cause dans cette pathologie. Les gènes présentant le plus de

⁶ <https://www.informatics.jax.org/>

⁷ <https://www.proteinatlas.org/>

⁸ <http://biogps.org/>

différences dans la séquence codante entre les versions *Spretus* et B6 sont recherchés en comptant le nombre de SNPs. En effet, pour un gène dont la séquence *Spretus* est assez différente de celle de B6, il est probable que l'expression de la version *Spretus* dans un génome B6 ne réponde pas aux mêmes éléments de régulation d'expression. De plus, dans ce cas de figure, la protéine de version *Spretus* exprimée pourrait ne pas présenter la même conformation et pourrait avoir des difficultés à interagir avec ses protéines partenaires ou cibles.

De cette façon, nous avons réduit le nombre de gènes potentiellement d'intérêt dans l'intervalle *Mafq1* à une première courte liste de 7 gènes qui avaient retenu notre attention : *Trip12*, *Fbxo36*, *Spata3*, *Pde6d*, *Efhd1*, *Dnajib3* and *Mroh2a*. Plus tardivement, un gène supplémentaire a été ajouté dans une nouvelle version du génome de la souris B6 : *Tex44*. Parmi eux, deux gènes sont spécifiquement exprimés dans le testicule et semblent de bons candidats pour expliquer l'apparition du phénotype de globozoospermie partielle chez les RC3. Il s'agit de *Spata3* et *Tex44*.

II. *Spata3*

Faisant partie des gènes candidats retenus et étant exprimé spécifiquement dans le testicule, nous nous sommes intéressés au gène *Spermatogenesis associated protein 3* (*Spata3*), également répertorié sous le nom de *Testis and Spermatogenesis cell Apoptosis Related Gene 1* (*Tsarg1*). *Spata3* est conservé entre les espèces mammifères placentaires et présente une homologie au niveau protéique d'environ 55% entre les versions souris et humaine. Par ailleurs, à la fois chez la souris et chez l'Humain, *Spata3* s'exprime spécifiquement dans les gamètes mâles, à partir du stade spermatides rondes jusqu'au stade de spermatozoïde. Cet intervalle d'expression correspond au stade de l'apparition et de la mise en place de l'acrosome. Ce gène était très peu référencé, et sa fonction n'était pas décrite. Dans une étude chez l'humain, l'expression de SPATA3 apparaît diminuée chez les patients infertiles présentant une azoospermie non obstructive idiopathique par rapport aux patients contrôles (Malcher et al. 2013).

Dans les bases de données, l'organisation du gène *Spata3* était peu décrite et a d'ailleurs été modifiée au cours de notre étude. Chez la souris et chez l'humain, il existe différentes isoformes identifiées de *Spata3* : une isoforme « longue » et différentes isoformes « courtes » (Cf. Article n°2 - Figure 2a). L'isoforme « longue » diffère des isoformes « courtes » par un exon 1 différent qui se situe plus en amont dans la séquence. Les exons suivants sont communs aux différentes isoformes. Dans ce projet, nous avons souhaité invalider le gène *Spata3* dans sa totalité en ciblant donc l'isoforme « longue ». Elle est constituée de 4 exons, dont 3 codants, et code pour une protéine de 333 acides aminés (données Ensembl.org). Le but du travail est donc de réaliser une invalidation complète du gène *Spata3* chez les souris C57BL6/J afin de déterminer si ce gène pourrait bien être impliqué dans la globozoospermie.

Afin d'étudier la fonction de *Spata3*, nous avons réalisé le KO *Spata3* dans une lignée de souris de souche B6 par la technique de CRISPR/Cas9 en utilisant des ARN guides situés en amont de l'exon 1bis et en aval de l'exon 3 de l'isoforme la plus longue de *Spata3* permettant ainsi de déléter l'ensemble de ses isoformes. Ne constatant pas d'altérations majeures chez les souris KO et soupçonnant un rôle de *Spata3* dans la fertilité et notamment dans la mise en place de l'acrosome, nous avons évalué la fertilité des mâles homozygotes KO *Spata3*. Tout d'abord nous avons réalisé un test de fertilité *in vivo* en accouplant des femelles Wild Type (WT) avec des mâles WT ou KO *Spata3*, puis nous avons relevé le nombre de naissances par portée. Les portées obtenues avec les mâles KO *Spata3* ($7,1 \pm 0,9$; $n = 9$) et WT ($6,7 \pm 0,5$; $n = 10$, $p = 0,71$) étaient de tailles comparables (Cf. Article N°2 - Figure 3a). Ces résultats obtenus *in vivo* montrent que *Spata3* n'est pas indispensable à la fécondation. Cependant, la fertilité *in vitro* des mâles KO *Spata3* était très diminuée par rapport à celle des mâles WT (Cf. Article N°2 - Figures 3b et 3c). En effet, la réalisation de FIV en cumulus intact et zona-free a permis d'étudier leur fertilité *in vitro*. Les mâles WT avaient un taux de fécondation de $34,9 \pm 3,9$ % ($n = 147$) d'ovocytes fécondés et un index de fécondation de $0,92 \pm 0,06$ ($n = 108$) spermatozoïdes par ovocyte. Les taux et index de fécondation obtenus avec les mâles KO *Spata3* apparaissaient significativement diminués avec des valeurs de $7,3 \pm 2,1\%$ ($n = 150$) et $0,35 \pm 0,04$ ($n = 118$) respectivement. Ainsi, *Spata3* n'est pas indispensable à la fécondation *in vivo*, mais en son absence, la fertilité *in vitro* est nettement affectée.

Afin de déterminer le rôle que joue *Spata3* dans la fécondation, nous avons réalisé les mesures d'un certain nombre de paramètres spermatisques tels que la concentration des spermatozoïdes, le niveau de réaction acrosomique spontanée, les paramètres de mobilité (obtenues avec l'analyse de sperme assistée par ordinateur ou Computer-Aided Sperm Analysis - CASA). Aucune différence entre les spermatozoïdes des mâles WT et KO *Spata3* n'a été relevée (Cf. Article N°2 – Figures 4a, 4c et 4d). Par ailleurs, en microscopie optique, aucun défaut morphologique des spermatozoïdes KO *Spata3* n'a été observé (Cf. Article N°2 – Figures 4b).

Pour aller plus loin dans la recherche de la fonction de *Spata3* dans la fécondation, en se basant sur notre hypothèse de départ et les phénotypes observés chez les mâles RC3, nous avons analysé les spermatozoïdes en microscopie électronique afin d'étudier s'ils présentaient des anomalies visibles au niveau ultra structural. En effet, nous avons pu observer que les spermatozoïdes KO *Spata3* étaient significativement plus nombreux à présenter une morphologie altérée par rapport aux spermatozoïdes WT (Cf. Article N°2 – Figure 5c). Nous avons pu constater différents défauts sur les spermatozoïdes délétés : acrosome partiellement ou totalement détaché du noyau, acrosome asymétrique, présence de gouttelettes lipidiques dans des corps résiduels persistants (Cf. Article N°2 – Figures 5a et 5b). Une coloration Oil Red O des spermatozoïdes a permis de confirmer la présence significativement plus importante de gouttelettes lipidiques dans les spermatozoïdes KO *Spata3* par rapport aux WT (Cf. Article N°2 – Figures 6a et 6b). Ainsi, la génération du KO *Spata3* a permis de reproduire seulement partiellement le phénotype observé dans la lignée

IRCS RC3 qui présentait une globozoospermie partielle. En effet, à l'inverse de la lignée RC3, les mâles KO *Spata3* sont apparemment normalement fertiles *in vivo* et leurs spermatozoïdes présentent des paramètres de mobilité spermatique non altérés. Cependant, tout comme dans la lignée RC3, leur fertilité *in vitro* apparaît diminuée, la présence de gouttelettes lipidiques dans des corps résiduels est retrouvée, et des défauts de l'acrosome ont été observés mais dans une moindre mesure que dans la lignée RC3. Ces éléments sont récapitulés dans tableau ci-dessous (Tableau 2).

R3	KO <i>Spata3</i>
Fertilité <i>in vivo</i> ↘	✗ Normal
Fertilité <i>in vitro</i> ↘	✓
Réaction acrosomique spontanée ↗	✗ Réaction acrosomique spontanée normale
Mobilité spermatique ↘	✗ Mobilité normale
Détachement de l'acrosome (~50%)	✓ ~15%
Gouttelettes lipidiques dans les corps résiduels	✓

Tableau 2 : Tableau récapitulatif comparant les phénotypes observés chez les lignées R3 et KO *Spata3*

Le fait que le KO *Spata3* ne reproduise que partiellement le phénotype de la lignée RC3 suggère qu'il pourrait exister d'autres gènes de l'intervalle *Mafq1* qui interviendraient dans l'apparition de ce phénotype de globozoospermie partielle. Nous avons donc poursuivi notre étude en ciblant l'autre gène spécifiquement exprimé dans le testicule présent dans *Mafq1* : *Testis expressed protein 44* (*Tex44*).

III. *Tex44*

Tout comme l'était *Spata3*, *Testis expressed protein 44* (*Tex44*) est très peu décrit dans la littérature et sa fonction n'est pas connue. *Tex44* appartient à une très grande famille de gènes : la famille TEX. Certains des gènes *Tex* ont pu être associés à des phénotypes

d'hypofertilité ou d'infertilité (Bellil et al. 2021). Chez l'humain et chez la souris, *Tex44* est spécifiquement exprimé dans le testicule et s'exprime dans les spermatides allongées ce qui correspond à la fin de la mise en place de l'acrosome (phase de maturation).

De la même façon que pour le KO *Spata3*, le KO *Tex44* a été généré en utilisant la technique CRISPR/Cas9 de façon à déléter l'ensemble de l'unique exon de *Tex44*. Afin d'étudier la fonction de *Tex44* dans la fécondation, nous avons réalisé des tests de fertilité *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, la taille des portées obtenues avec les mâles KO *Tex44* ($2,9 \pm 0,85$; $n = 15$) était significativement diminuée par rapport à celles obtenues avec les mâles WT ($7,1 \pm 0,85$; $n = 14$) (Cf. Article N°3 – Figure 2a). Une deuxième expérience *in vivo* a été réalisée en stimulant l'ovulation de femelles WT puis en les mettant en accouplement avec des mâles WT ou KO *Tex44*. Les femelles présentant un bouchon vaginal ont été sacrifiées et les cumulus récupérés afin d'évaluer le taux de fécondation *in vivo*. Cette expérience a confirmé les résultats du premier test puisque le taux de fécondation obtenu avec les mâles KO *Tex44* était de $19,6 \pm 0,04$ % ($n = 92$) et celui obtenu avec les mâles WT était de $96,1 \pm 0,04$ % ($n = 129$) (Cf. Article N°3 – Figure 2b). Les tests de fertilité *in vitro* ont là encore montré une fertilité fortement diminuée des mâles KO *Tex44* avec des taux et index de fécondation de $0,8 \pm 0,04$ % ($n=124$) et $0,14 \pm 0,11$ ($n = 55$) respectivement (Cf. Article N°3 – Figures 2c et 2d). En parallèle, les mâles WT présentaient un taux de fécondation de $44,4 \pm 0,04$ % ($n = 151$) d'ovocytes fécondés et un index de fécondation de $1,2 \pm 0,11$ ($n = 50$) spermatozoïdes par ovocyte (Cf. Article N°3 – Figures 2c et 2d). Les fertilités *in vivo* et *in vitro* des mâles KO *Tex44* sont très fortement diminuées.

Pour déterminer la cause de cette forte hypofertilité, nous avons analysé le sperme des mâles KO *Tex44* au CASA. La mesure des paramètres spermatiques n'a pas montré de différence de concentration spermatique mais une mobilité très diminuée des spermatozoïdes KO *Tex44* avec $8,7 \pm 0,03$ % de mobilité par rapport aux spermatozoïdes WT qui eux présentaient une mobilité de $63,2 \pm 0,03$ % de mobilité (Cf. Article N°3 – Figures 3b et 3c). Les observations des spermatozoïdes au microscope ont montré que les spermatozoïdes KO *Tex44* présentaient des anomalies du flagelle au niveau de la jonction entre la pièce intermédiaire et la pièce principale. En effet, des disjonctions et des courbures en épingle à cheveux de cette zone ont été observées (Cf. Article N°3 – Figures 4b et 4d).

En analysant les spermatozoïdes au niveau des différentes régions de l'épididyme, nous avons pu constater que la proportion de spermatozoïdes KO *Tex44* présentant des courbures flagellaires en épingle à cheveux augmentait au fur et à mesure du trajet des spermatozoïdes le long de l'épididyme. En effet, au niveau de la tête de l'épididyme seulement 12 % des spermatozoïdes KO *Tex44* présentaient des courbures de leur flagelle, alors qu'ils représentaient 58 % des spermatozoïdes dans le corps de l'épididyme jusqu'à atteindre une proportion de 80 % des spermatozoïdes présentant ces courbures lorsqu'ils ont été prélevés au niveau de la queue de l'épididyme (Cf. Article N°3 – Figure 5). Les spermatozoïdes KO *Tex44* prélevés au niveau du testicule n'ont pas montré de défaut de courbure flagellaire mais un

amincissement de leur flagelle entre la pièce intermédiaire et la pièce principale a été observé pour 65 % d'entre eux (Cf. Article N°3 – Figure 5).

Une analyse plus poussée au microscope électronique a permis de mieux décrire ces anomalies flagellaires. D'une part, nous avons constaté les disjonctions et les cassures de flagelles au niveau de l'annulus qui avaient été observées en microscopie optique (Cf. Article N°3 – Figures 4f-g). D'autre part, nous avons pu constater la présence de mitochondries parfois mal disposées ainsi que l'absence de certains doublets de microtubules, et des fibres denses associées, au niveau des pièces principales des flagelles des spermatozoïdes KO *Tex44*. Au total, $63,6 \pm 0,06$ % des spermatozoïdes KO *Tex44* présentaient des anomalies au niveau de la pièce principale de leur flagelle contre seulement $4,2 \pm 0,06$ % des spermatozoïdes WT (Cf. Article N°3 – Figures 6a-b). Cependant, aucune anomalie de l'acrosome n'a pu être observée chez ces individus.

Les disjonctions et les cassures de flagelles des spermatozoïdes KO *Tex44* se situant au niveau de la jonction entre la pièce intermédiaire et la pièce principale, nous nous sommes demandés si la structure de l'annulus était anormale. En effet, l'annulus, ou anneau de Jensen, est une structure fibreuse en anneau sous-membranaire qui se situe à la jonction des pièces intermédiaire et principale. Nous avons alors réalisé un immunomarquage de l'un de ses composants, la protéine SEPTINE 4 (SEPT4) (Escalier et Touré 2012). Cet immunomarquage des spermatozoïdes KO *Tex44* a révélé un marquage SEPT4 en anneau entre les pièces intermédiaire et principale des flagelles suggérant ainsi que l'annulus est bien présent et ne présente pas d'anomalies (Cf. Article N°3 – Figure 7).

Enfin, ayant observé en microscopie électronique la présence de mitochondries mal organisées, nous avons voulu déterminer l'activité mitochondriale des spermatozoïdes KO *Tex44* en utilisant une sonde qui s'accumule dans les mitochondries en activité, le Mitotracker™ CMTMRos. Nous avons pu observer que contrairement aux spermatozoïdes WT dans lesquels l'intensité de fluorescence relative et donc l'activité mitochondriale était distribuée uniformément, les spermatozoïdes KO *Tex44* ont présenté une distribution inégale, avec une surreprésentation significative des mitochondries apparaissant avec une faible intensité de fluorescence, suggérant des anomalies d'organisation ou de transit dans le flagelle (Cf. Article N°3 – Figure 8).

Ainsi, les mâles KO *Tex44* présentent quelques similitudes avec le phénotype observé dans la lignée RC3 mais également beaucoup de différences. En effet, les mâles de ces deux lignées sont fortement hypofertiles *in vivo* et *in vitro*, et la mobilité de leurs spermatozoïdes est diminuée. Cependant, les causes de ces observations ne semblent pas être les mêmes pour ces deux lignées. Les spermatozoïdes KO *Tex44* ne présentent pas d'anomalies au niveau de l'acrosome, contrairement aux RC3, mais ont des anomalies flagellaires qui expliquent la diminution de leur mobilité et l'hypofertilité qui en découle.

IV. Article N°1

Identification of a New QTL Region on Mouse Chromosome 1 Responsible for Male Hypofertility : Phenotype Characterization and Candidate Genes

Publié dans *International Journal of Molecular Sciences (IJMS)* le 12 Novembre 2020

*Magalie Vatin**, *Marie-Sophie Girault**, *Virginie Firlej*, *Carmen Marchiol*, *Côme Ialy-Radio*, *Xavier Montagutelli*, *Daniel Vaiman*, *Sandrine Barbaux* et *Ahmed Ziyyat*

*These authors contributed equally to this work.

DOI : 10.3390/ijms21228506



Article

Identification of a New QTL Region on Mouse Chromosome 1 Responsible for Male Hypofertility: Phenotype Characterization and Candidate Genes

Magalie Vatin ^{1,†,‡}, Marie-Sophie Girault ^{1,†}, Virginie Firlej ¹ , Carmen Marchiol ¹ ,
Côme Ialy-Radio ¹, Xavier Montagutelli ² , Daniel Vaiman ¹ , Sandrine Barbaux ¹
and Ahmed Ziyat ^{1,3,*}

¹ Institut Cochin, Université de Paris, INSERM, CNRS, F-75014 Paris, France; magalie.inamo-vatin@univ-antilles.fr (M.V.); marie-sophie.girault@inserm.fr (M.-S.G.); virginie.firlej@u-pec.fr (V.F.); carmen.marchiol@inserm.fr (C.M.); come.ialy-radio@inserm.fr (C.I.-R.); daniel.vaiman@inserm.fr (D.V.); sandrine.barbaux@inserm.fr (S.B.)

² Mouse Genetics Laboratory, Institut Pasteur, F-75015 Paris, France; xavier.montagutelli@pasteur.fr

³ Service d'histologie, d'embryologie, Biologie de la Reproduction, AP-HP, Hôpital Cochin, F-75014 Paris, France

* Correspondence: ahmed.ziyat@parisdescartes.fr

† These authors contributed equally to this work.

‡ Present address: UMR 7205 ISYEB and University of the Antilles, Pointe à Pitre, 97157 Guadeloupe, France.

Received: 25 October 2020; Accepted: 9 November 2020; Published: 12 November 2020



Abstract: Male fertility disorders often have their origin in disturbed spermatogenesis, which can be induced by genetic factors. In this study, we used interspecific recombinant congenic mouse strains (IRCS) to identify genes responsible for male infertility. Using ultrasonography, in vivo and in vitro fertilization (IVF) and electron microscopy, the phenotyping of several IRCS carrying mouse chromosome 1 segments of *Mus spretus* origin revealed a decrease in the ability of sperm to fertilize. This teratozoospermia included the abnormal anchoring of the acrosome to the nucleus and a persistence of residual bodies at the level of epididymal sperm midpiece. We identified a quantitative trait locus (QTL) responsible for these phenotypes and we have proposed a short list of candidate genes specifically expressed in spermatids. The future functional validation of candidate genes should allow the identification of new genes and mechanisms involved in male infertility.

Keywords: infertility; spermatogenesis; teratozoospermia; globozoospermia; IRCS

1. Introduction

In approximately half of the 15% of couples that suffer from sterility, the cause is ascribed to male infertility, which encompasses a wide variety of syndromes. In more than half of infertile men, the cause is classified as idiopathic and may be due to genetic factors. Genetic defects leading to male infertility often affect spermatogenesis or sperm function [1].

Spermatogenesis is a biological process composed of a series of highly complex cellular events. It can be broadly divided into five discrete events: (1) renewal of spermatogonial stem cells and spermatogonia via mitosis, (2) proliferation (via mitosis) and differentiation of spermatogonia, (3) meiosis, (4) spermiogenesis (transformation of round spermatids into elongated spermatids and spermatozoa) and (5) spermiation, the release of sperm from the epithelium into the tubule lumen. All steps are highly regulated and dysfunctions in this key physiological process can result in infertility. Regulation of this complex process depends on the cooperation of many genes, which are expressed at these different steps [2]. Problems during spermatogenesis are most often

reflected in a no or low production of spermatozoa and are described by routine semen analysis as azoospermia, oligozoospermia, teratozoospermia, asthenozoospermia or a combination of the last three (oligoasthenoteratozoospermia). Teratozoospermia is defined by morphologic sperm abnormalities. Globozoospermia is a rare and severe form of teratozoospermia characterized by round-headed spermatozoa lacking an acrosome, an important and specific organelle that plays a crucial role during fertilization. During spermiogenesis, diverse cellular and molecular processes allow sperm head formation and organization. Mutant models have improved the understanding of the etiology of teratozoospermia and clarified some of the mechanisms involved in sperm head formation and organization [3].

Identification of genes that play a crucial role in spermatogenesis is mainly based on observations in rodents. In particular, the mouse model appears to be an excellent model to study human infertility due to the conservation of the great majority of genes and processes involved in sperm production [4]. In order to identify genetic causes of infertility, we used the interspecific recombinant congenic mouse strains (IRCS) panel developed at the Institut Pasteur (Paris, France) [5]. The IRCS model harbors about 2% of *Mus spretus* (SEG/Pas) genome at a specific and known location inside a *Mus musculus domesticus* (C57BL/6J strain) background. The high polymorphism between *spretus* and *musculus* makes it possible to identify the quantitative trait locus (QTL) regions responsible for phenotypic variation in a given IRCS strain compared to the reference strain, C57BL/6J (B6) [5–9]. The phenotyping of the Rc3 strain, a congenic strain derived from the BcG-66H IRCS, led us to identify spermatogenesis defects such as acrosomal or flagellar anomalies that are absent in the B6 reference strain. The combination of phenotypic and fine mapping approaches allowed us to map the Mafq1 (male fertility QTL chromosome 1) locus on a unique *spretus* fragment on mouse chromosome 1 and to identify a short list of candidate genes responsible for the spermatogenesis defects and male hypofertility of the Rc3 strain.

2. Results

2.1. In Vivo Phenotyping

We have previously presented the generation of the subcongenic substrains (named Rc) from the 66HMMU1 strain by recombination events inside the MMU1 *spretus* segment [9]. Each of these substrains differ from B6 (control) due to the presence of a unique *spretus* fragment on the chromosome 1 in their genome that overlaps with those of the other substrains (Figure 1).

Here we present the phenotyping of the Rc3 substrain compared to the B6 strain, by using an in vivo ultrasonic method to evaluate the implantation rate at E7.5 and E9.5. For this, we carried out inbred crosses between males and females from each substrain and determined the mean of implanted embryos. We observed a significant reduction in the mean number of implanted embryos in the Rc3 × Rc3 crosses compared to B6 × B6 controls. To know whether the defect observed in Rc3 originated from the female or the male side, we performed two reciprocal F1 crosses: Rc3 males with B6 females and B6 males with Rc3 females. The number of implanted embryos was reduced only in the crosses involving Rc3 males ($p < 0.001$) and we concluded that the defect was due to the male. The Rc4 substrain, which carries a partially overlapping *spretus* chromosomal fragment did not show a hypofertility phenotype (Figure 2).

2.2. Phenotype Characterization

To identify the origin of the male defect(s), we focused on mating between Rc3 males and B6 females. The next day, to verify in vivo fertilization, we collected and counted the number of fertilized oocytes from the ampullae of the females presenting with a vaginal plug. We compared the results from the B6 × Rc3 with those from the B6 × B6 controls and we observed a significant ($p = 0.036$) reduction in the fertilization rate with Rc3 males ranging from $73 \pm 6\%$ for the B6 control to $53 \pm 7\%$ for the Rc3 substrain (Figure 3).

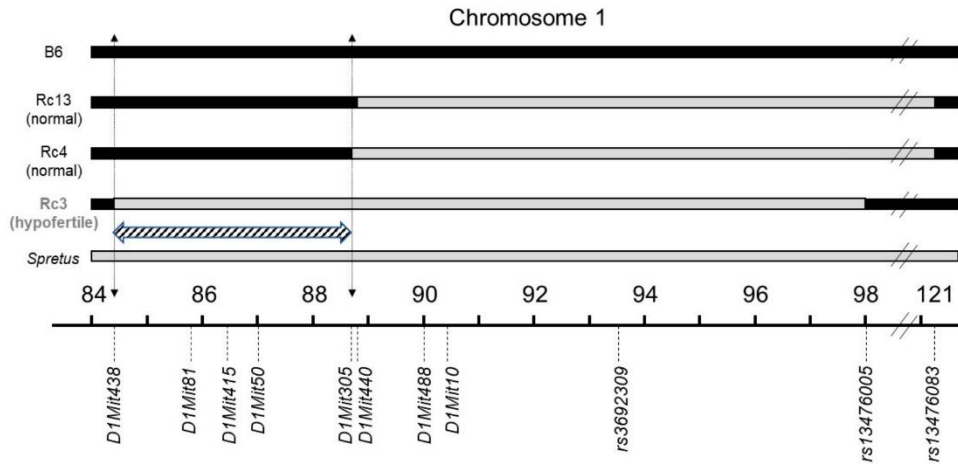


Figure 1. Genotypes of the different recombinant strains (Rc) and the parental strains (*spretus* and B6). Recombinant strains (Rc) were generated at the Institut Pasteur (Paris) from the 66HMMU1 strain by recombination events inside the MMU1 *spretus* segment. Black regions correspond to B6 background, grey regions to *spretus* fragments and the minimal *spretus* region responsible for the phenotype of interest is highlighted in hatched on chromosome 1. Marker positions are given in mega base pairs (Mb). Genome version GRCm38.p6.

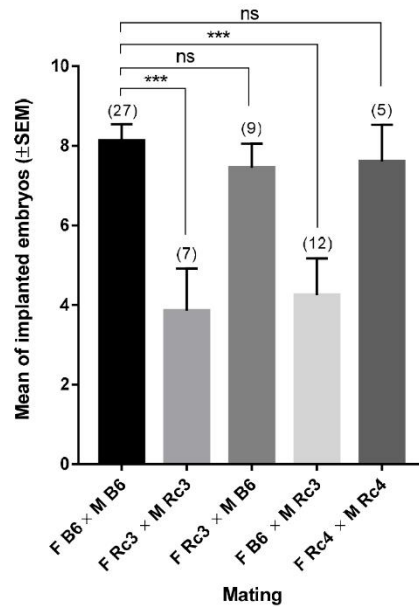


Figure 2. Ultrasonographic examination of the implantation in different crosses using mice from Rc3, Rc4 and B6 strains: Different crosses were performed using males (M) and females (F) from Rc3, Rc4 and B6 strains. The results are presented as the mean (±SEM) of implanted embryos. (): number of gestations. ns: non significant. ***: $p < 0.001$.

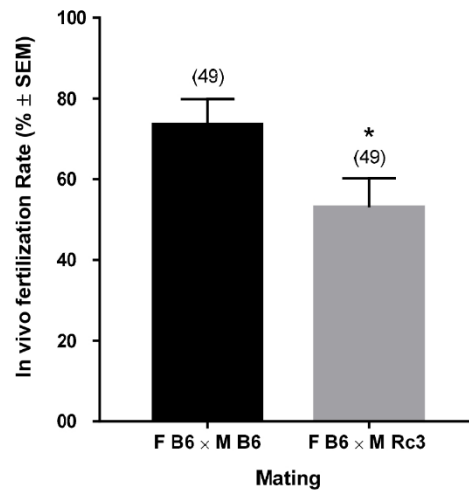


Figure 3. Evaluation of in vivo fertilization: B6 females were mated with B6 or Rc3 males to evaluate their respective capacity to fertilize oocytes in vivo. The mating was performed on the night and the next day, oocytes from oviducts of females with a positive vaginal plug were collected. The fertilization was assessed using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluorescent staining. The results are presented as the mean of the fertilization rate (%) ± SEM using t-test. * $p = 0.036$. F: female, M: male. () number of oocytes.

We also performed in vitro fertilization (IVF) using B6 oocytes and Rc3 versus B6 epididymal sperm. We observed a significant reduction of Rc3 (B6 oocytes and Rc3 epididymal sperm) fertilizing ability with a Fertilization Index (FI: mean of sperm number fused by egg) of 0.33 ± 0.06 , compared to B6 controls (B6 oocytes and B6 epididymal sperm) with a FI of 1.18 ± 0.06 ($p < 0.0001$). Interestingly, when we increased the concentration of Rc3 sperm (10 times), the FI was brought back to normal values (FI = 1.08 ± 0.05 , $p = 0.47$) (Figure 4).

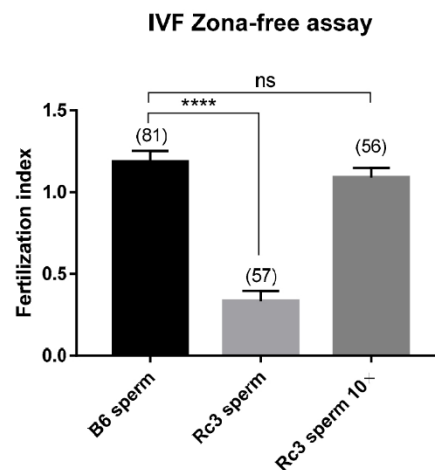


Figure 4. Evaluation of in vitro fertilization (IVF). The fertilization index (or mean ± SEM of sperm number fused by egg) was assessed by zona-free IVF assay at 10^5 (B6 and Rc3 sperm) or 10^6 (Rc3 sperm 10x) sperm per mL. Experiments were repeated at least three times. (): number of oocytes. ns: non significant. ****: $p < 0.0001$.

2.3. Characterization of the Sperm Defect of the Rc3 Males

To identify the origin of this sperm dysfunction, we first counted the sperm of B6 and Rc3 males used for IVF assays and we did not observe any significant difference between the two groups ($29.67 \pm 1.85 \times 10^6$ ($n = 3$) for the B6 males and $32.33 \pm 3.18 \times 10^6$ ($n = 3$) for the Rc3 males) (Figure 5a, $p = 0.5$).

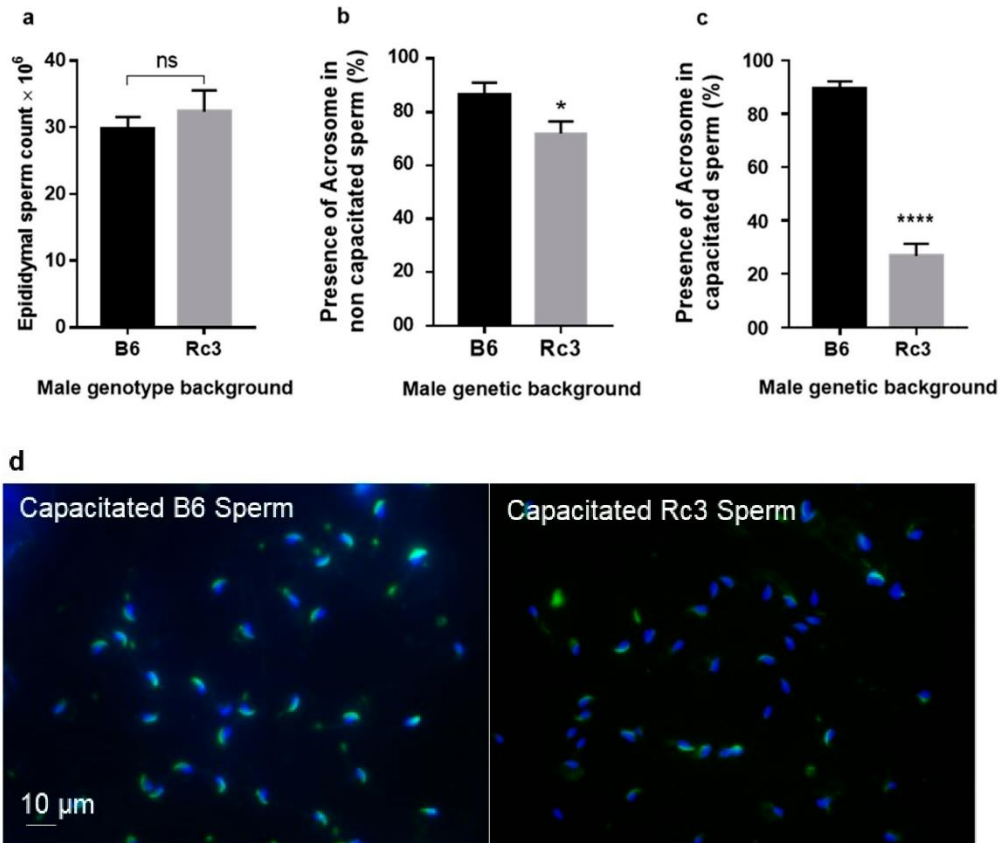


Figure 5. (a). Evaluation of epididymal sperm count on B6 and Rc3 using Malassez slide. Estimation of the percentage of the presence of acrosome on non-capacitated (b) and capacitated (c) B6 and Rc3 epididymal sperm. (d) As shown in these illustrative slides, for this analysis, nuclei were stained with DAPI (blue) and the acrosomal region with PSA-FITC (green). ns: non significant, * $p = 0.03$, **** $p < 0.0001$.

After an inconclusive morphological observation under phase-contrast microscopy, Rc3 sperm were observed and compared to B6 sperm using fluorescence microscopy with PSA-FITC (Pisum sativum agglutinin conjugated to fluorescein) labelling to detect the presence of sperm acrosome and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) for nucleus. A slight difference ($p = 0.03$) in the presence of sperm acrosome was observed on non-capacitated freshly recovered epididymal sperm, in which the acrosome was present in $86.4 \pm 4.5\%$ of B6 sperm and in $71.8 \pm 4.6\%$ of Rc3 sperm (Figure 5b). After 90 min of capacitation in Ferticult medium supplemented with 3% Bovine Serum Albumin (BSA) at 37°C under 5% CO_2 , this percentage remained approximately the same for B6 sperm ($89.4 \pm 2.6\%$), while in sperm from Rc3 males this percentage dropped drastically to only $26.8 \pm 4.5\%$ ($p < 0.0001$, Figure 5c). These results likely reflect a defect at the acrosome level, which leads to early loss of the acrosome during capacitation by spontaneous acrosome reaction (sAR).

These results were completed by observing the sperm motility under a microscope, as carried out during IVF experiments. While B6 sperm showed a total mobility exceeding 50% on average, those of Rc3 rarely exceeded 20%. When we looked at the fraction of sperm that showed progressive motility, this percentage dropped from 20% to 25% for B6 sperm to 10% at best for Rc3 sperm.

Alterations in sperm could explain the high rate of spontaneous acrosomal reaction that occurred during capacitation. In order to investigate whether discrete alterations exist at the ultrastructural level, a second observation of Rc3 and B6 sperm was performed using electron microscopy (EM). A slight acrosome defect consisting of a detachment between the anterior part of the acrosome and the nucleus was observed in about half of Rc3 sperm (Figure 6a). This acrosomal defect was not seen in B6 control sperm. EM also revealed anomalies of the flagella (Figure 6b). Indeed in Rc3 sperm, residual bodies at the flagella, also not found on B6 sperm, were observed in 15 to 20% of sperm. These residual bodies contain large lipid droplets that likely reflect a metabolic dysfunction and/or spermiation defect.

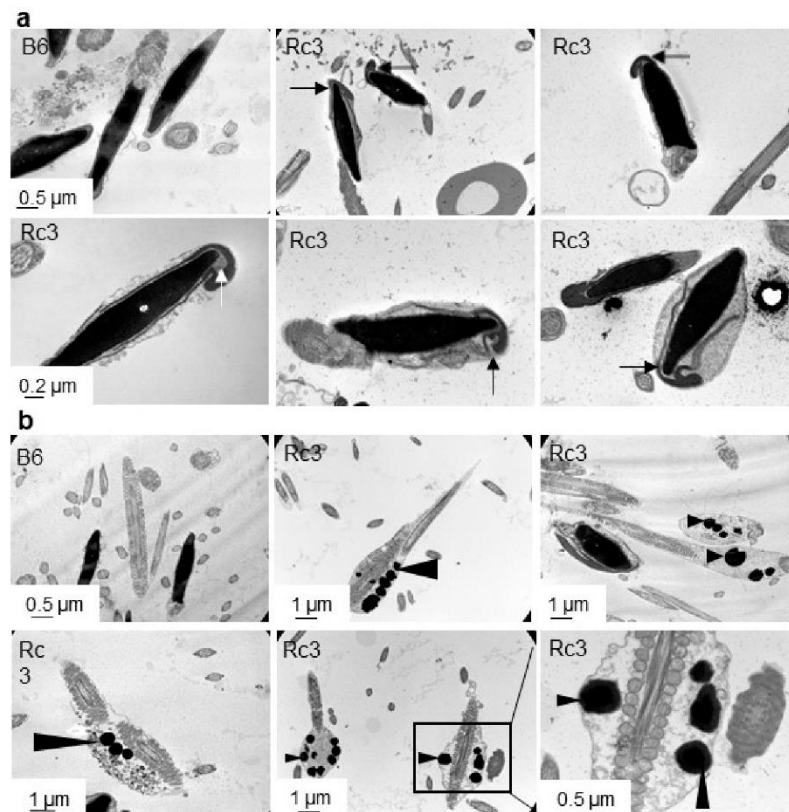


Figure 6. Observation of B6 and Rc3 sperm heads (a) and flagella (b) using electron microscopy. No abnormality was observed on B6 sperm where nuclear and inner acrosomal membranes seem joined, whereas the acrosome seems abnormally attached to the nucleus in approximately 50% of the sperm head of Rc3 males (a, arrows), in addition to the presence of lipid droplets (b, arrowheads) in the residual bodies at the level of the midpiece in approximately 15% of the sperm.

2.4. QTL Fine Mapping

The Rc3 substrain differs from the B6 strain by a *spretus* fragment of about 14 Mb on the MMU1 chromosome delimited by *D1Mit438* and *rs13476005* markers (see Figure 1). This *spretus* region contains gene(s) responsible for the observed phenotype. We undertook to decrease the size of the fragment.

Since the Rc4 strain does not show the hypofertility phenotype (Figures 1 and 2), we excluded the *spretus* region of 4 Mb between the two markers, *D1Mit305* and *rs13476005* that are shared by Rc3 and Rc4. Therefore, we defined a QTL region of about 4.2 Mb on chromosome 1 between *D1Mit438* and *D1Mit305* (hatched zone in Figure 1) as responsible for male hypofertility. We named this QTL *Mafq1* (Male fertility QTL chromosome 1).

2.5. Identification of Candidate Genes in the QTL Region Responsible for Rc3 Sperm Phenotype

We explored the *Mafq1* interval to identify candidate genes whose presence in the *spretus* haplotype within a B6 background could be responsible for the hypofertility phenotype. Table S1 compiles all sequences described in different databases as protein coding genes (n = 71), processed transcripts (n = 37), pseudogenes (n = 50) and non coding RNAs (n = 48). We also documented their expression profile, when available, at the RNA and protein level, in order to focus on genes expressed in the testis and preferably at the spermatid stage to explain the dysfunction of the acrosome. Some genes have already been invalidated in mouse models (n = 28), and although some of these knockout (KO) models expressed phenotypes that are overall related to reproduction, notably, none of them could recapitulate the particular features observed in the Rc3 mouse. The supposed or validated function of the protein has also been documented in the literature. Finally, we counted the single nucleotide polymorphisms (SNPs) with putative functional impact between *spretus* and B6, particularly in the open reading frames where they could be responsible for structural changes affecting protein interactions. Therefore, we applied these filters to select the most relevant candidates genes. We identified 8 genes highly expressed in the testis: *Trip12*, *Fbxo36*, *Spata3*, *Tex44*, *Pde6d*, *Efh1*, *Dnajb3* and *Mroh2a*, of which two are exclusively expressed in the testis (*Spata3* and *Tex44*).

Because the differences in the expression level (mRNA) depended on the databases, we performed qRT-PCR experiments in order to analyze the expression of several candidate genes in the testis. The different cellular populations of the testis were sorted by flow cytometry, and the expression level of *Spata3*, *Dnajb3*, *Pde6d* and *Efh1* was evaluated (Figure 7). While three of them appeared to be expressed at different stages of spermatogenesis, *Spata3* was exclusively expressed at the spermatid stage.

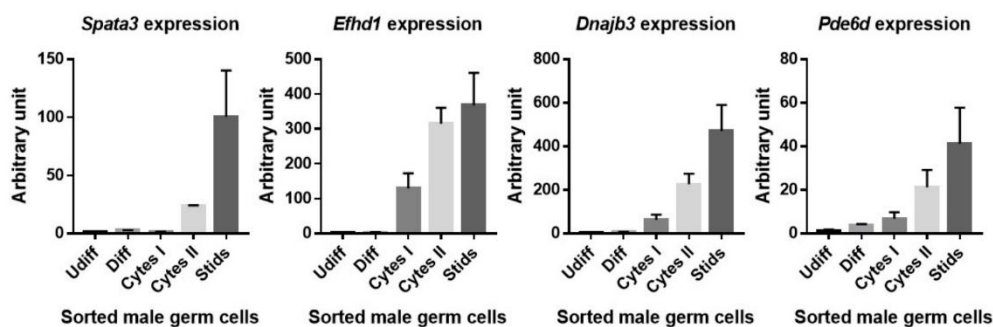


Figure 7. Expression level of four genes during the different stages of spermatogenesis. To determine the stage of spermatogenesis in which these four genes are expressed, the different male germ cell populations were separated by flow cytometry and the expression levels were measured by qRT-PCR. Undifferentiated (Udifff), differentiated (Diff) spermatogonias, primary (Cytes I) and secondary (Cytes II) spermatocytes, spermatids (Stids).

3. Discussion

In previous studies, we have shown that IRCS mice can provide novel phenotypes of interest and that they have the power to identify the responsible gene [9–12]. As an example, we have proposed *Fidgetin-like1* (on chromosome 13) as a strong candidate for the dynamic impairment of male meiosis, which leads to reduced testis weight in mice [8]. This gene has been described as pivotal for meiotic

recombination [13]. This approach allows the identification of new loci and genes that can be important for gametogenesis and whose study can improve our knowledge about infertility disorders.

Similarly, here, using these IRCS lines, we have shown an association between a QTL on chromosome 1 (*Mafq1*) present in the IRCS-derived Rc3 subcongenic strain and male hypofertility. For this, we first used the ultrasonic method to estimate the number of implanted embryos in reciprocal crosses involving B6 and Rc3 females mated with either Rc3 or B6 males. The number of implantation sites was significantly lower in both B6 and Rc3 females when mated with Rc3 males, although we did not observe any difference in terms of embryonic resorption. This led us to assess the fertilizing ability of Rc3 sperm. Indeed, *in vivo* as *in vitro*, the fertilization rate was found to be lower with the sperm obtained from Rc3 males. We did not observe any obvious morphological alterations under light microscopy but found reduced mobility in Rc3 sperm; thus, we increased the sperm concentration of Rc3 by 10 during IVF. This made it possible to restore the fertilization index to the same level with B6 sperm. The decrease in fertilization ability observed *in vitro* was greater than that observed *in vivo*. This difference is probably explained by the optimal conditions and high efficacy of *in vivo* fertilization compared to *in vitro* fertilization [14]. The second explanation is that the sperm make a long journey in the female genital tract. The sperm motility is one of the elements contributing to the success of this journey. As a result, a form of selection takes place and sperm with significantly reduced motility do not reach the oviduct. Conversely, *in vitro*, sperm are directly deposited in contact with oocytes and even those with reduced motility participate to the fertilization. This could further reduce the fertilization rate. Therefore, IVF better reveals minor functional alterations, as seen in our other examples regarding sperm from *Spaca6* heterozygous mutant males [15].

We then looked for the presence of the acrosome. While this was similar on non-capacitated sperm, the acrosome seemed to be absent more often after capacitation in Rc3 sperm, reflecting an early sAR on Rc3 sperm and the potential fragility of the acrosome. Early sAR may not enable the fertilization process to proceed but the timing of the acrosome reaction (AR) seems to be flexible [16]. The spontaneous acrosomal reaction is a physiological phenomenon, but its frequency increases in the Rc3 strain [17,18]. In humans, sperm with high proportion of sAR result in poor success in IVF [19]. Via its ability to prevent early sAR before reaching the female genital tract, Paraoxonase 1 activity seems to have a positive effect on fertility [20]. In mice, this question remains debatable. For example, the disruption of mouse *CD46* causes an accelerated sAR, but also the facilitation of fertilizing ability of males [21]. Supporting this idea, Sebkova et al. showed that the relocation of Izumo1 takes place normally even after sAR [18]. This apparent contradiction could probably be explained by the exact timing and magnitude of this early acrosomal reaction. These questions could be addressed by invalidating candidate genes.

The electron microscopy analysis finally made it possible to specify the defect in Rc3 sperm by highlighting a detachment of the acrosome that does not adhere correctly to the nucleus. This indicates that the protein involved in this phenotype could be localized at the level of the inner membrane of the acrosome, of the nuclear membrane, or even between the two at the level of the acroplaxome. If not, this protein could be localized elsewhere but have an indirect action via a regulatory role. Such a phenotype has already been observed in *Hipk4* (homeodomain-interacting protein kinase 4) KO mice demonstrating that this gene is essential for murine spermiogenesis as a regulator of the shape of the sperm head [22], or in germ cell-specific *Sirt1* KO infertile mice where disrupted spermiogenesis caused defects in acrosome biogenesis, which resulted in a phenotype similar to that observed in human globozoospermia [23]. In addition, the absence of DPY19L2, an inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in human and in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus [24,25]. The phenotype that we describe here suggests an abnormal organization of the acrosome. Admittedly, the observed phenotype is not as drastic as those mentioned above, which might suggest that the genetic defect in the Rc3 strain, probably resulting from the presence of a protein with altered function, could be different from the one observed in the complete absence of the protein as in the case of KO mice. However, this difference could be sufficient to prevent, at least partially,

normal protein interactions, thus reinforcing the idea of the “transcriptomic shock” resulting from the brutal contact between two divergent genomes [6]. This morphological abnormality seems to characterize a teratozoospermia, like partial globozoospermia.

The second phenotype revealed by electron microscopy is the presence of residual cytoplasm that contains numerous lipid droplets on a fraction of Rc3 sperm. This phenotype reflects some defects in spermiation. Because the epididymal sperm concentration in Rc3 strain was similar to that of the controls, we can conclude that the production and disengagement of spermatids, and their release towards the lumen of the seminiferous tubules was normal. Nevertheless, about 20% of Rc3 sperm still present residual bodies, which suggests a defective phagocytosis process. This phenotype could have its origin in a dysfunction either at the spermatids level or at the Sertoli cells level and could also explain the persistence of lipid droplets in the residual bodies. Indeed, the phagocytosis of residual bodies is associated with a peak in the number of lipid droplets at the base of the Sertoli cell, as observed in various species [26]. Alternatively, the presence of these lipid droplets in epididymal sperm could also reflect a metabolic dysfunction.

At this stage, it is not possible to know whether one and the same protein is responsible for the two distinct observed phenotypes. Further investigations are needed. These will probably require invalidating one or more genes present in the *Mafq1* interval. We hypothesize that one or more genes from the interval have an epistatic interaction with one or more genes outside of the interval; in the Rc3 strain, the *spretus* allele(s) fail to interact properly with the B6 allele(s). This relation could be the participation of heterodimers to a proteic complex or ligand-receptor binding for example. One of these candidate genes could be related to the *Hipk4*, *Sirt1* or *Dpy9l2* genes, whose invalidation affects acrosome biogenesis in mice or humans. The production and fine genetic characterization of partially overlapping strains defined a genetic interval associated with the above-described phenotypes.

The number of genes is important in this interval (71 coding genes); therefore, we then applied several filters in order to prioritize those that are more likely to cause the phenotypes observed during our study.

According to the expression database that was consulted, 22 genes out of a total of 71 are reported to be expressed in the testis (see Table S1). The inactivation of 14 of them did not result in spermatogenesis defects (for references, see Table S1). Of these 14 genes, the case of *Dnajb3* is questionable. Indeed, this gene was initially described as exclusively expressed in the testis and particularly at the spermatid stage [27,28] in the developing acrosomal vesicle and sperm centriolar region [29]. However, other studies found its expression in other tissues [30–33]. Its role seemed to be related to proteasome and protein quality control [34] but also to insulin signaling, glucose uptake and oxidative stress [30,35]. Although only two coding SNPs differ between B6 and *spretus*, the *spretus* allele of one of them is predicted to be deleterious on protein structure (SIFT, Ensembl (www.ensembl.org)) (Table S1). Finally, a KO strain available from the Jackson Laboratory (<https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1306822>) showed no reproductive phenotype. These latest data seem to downplay the role of *Dnajb3* in spermatogenesis, either because its participation in this process is not essential or because its function is compensated for by another gene in KO models.

Among the genes remaining in the short list and for which the KO model does not exist, *Armc9* gene mutations have been described in human Joubert syndrome, but the variety of phenotypes does not include a phenotype related to reproduction. In addition, Van De Weghe et al. found that CRISPR/Cas9-mediated KO of *armc9* in zebrafish resulted in curved body shape, retinal dystrophy, coloboma, reduced cilia number in ventricles, and shortened cilia in photoreceptor outer segments [36]. *Cops7b* and *Chrnd* are not expressed in mouse testis but their expression is described in human testis. Mutations of *CHRND* gene in humans have been reported to be associated with congenital myasthenic syndrome [37–39]. *Efh1* is expressed in testis but also in ovary, kidney and placenta (Table S1). *Mroh2a* shows ubiquitous expression but with a higher level of expression in the testis while *Hjurp* is

not expressed in mouse testis. The testicular expression of the *Glrp1* gene is described in one database but not in another and no orthologous gene is described in humans.

The filters that we applied make it possible to exclude some genes such as those that are not expressed in the testis, those for which the KO does not show a spermatogenesis phenotype and even those without significant SNPs. These filters make it possible to highlight two genes that are probably involved in the observed phenotype. These are *Spata3* and *Tex44*, which present an expression profile restricted to the testis, and particularly in the spermatid. Our verification by qRT-PCR indicated the post-meiotic expression (at the spermatid stage) of *Spata3*, which confirmed the data found in the expression databases. The expression profile at the protein level given by Protein Atlas indicates their presence only at the spermatid stage in human testis. These two genes have not been studied in the literature, and sequence analysis does not help to relate them to known protein families and to suggest a particular function. Although the name “*Spata*”, meaning “spermatogenesis associated” is common to several dozen genes, no particular functions or domains link these genes. As for *Tex44*, *Spata3* was identified as a gene very recently. Nevertheless, they both accumulate SNPs in coding sequences that could modulate protein structure and/or function and interactions with other partners expressed in a B6 version in the IRCS. Therefore, they appear as the best candidates.

4. Materials and Methods

4.1. Ethics Statement

All animal experiments were performed in accordance with national guidelines for the care and use of laboratory animals. Authorizations were obtained from local (C2EA-34, Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale Paris Descartes) and governmental ethical review committees via APAFIS Application (Autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques), Authorization APAFIS #14124-2017072510448522 v26, A. Ziyat (2018–2023).

4.2. Animals

The generation of the recombinant substrains from BcG-66H and 66HMMU1 at the Institut Pasteur (Paris) has been previously reported [5,9]. After weaning, 4-week-old mice were maintained in an animal facility at the Cochin Institute (Paris) at normal temperature (21–23 °C) and 14 h light/10 h dark photoperiods with free access to water and food. For all experiments, animals were sacrificed by cervical dislocation.

4.3. Phenotyping by High Frequency Ultrasonography Evaluation of *in Vivo* Fertilization

To evaluate the implantation rate, mice from B6 (reference strain) and Rc strains were crossed and phenotyped at the small animal imaging facility of the Cochin Institute using high frequency ultrasonography (VEVO 770, Visulasonics, Toronto, Canada). Each female was used one time to collect phenotypic data from the primo-gestation. Briefly, a chemical hair remover was used to eliminate abdominal hair. Ultrasonographic contact gel was used to ensure contact between the skin surface and the transducer. Body temperature, electrocardiographic and respiratory profiles were monitored using the device's integrated heating pad and monitoring device (THM150, Indus Instruments, Webster, TX, USA). The implantation rate was determined early in the gestation, at E7.5 and E9.5. At these stages, the small size of the embryos permits a fluent count and resorbed embryos are also visible.

4.4. Evaluation of *in Vivo* Fertilization

B6 females were mated with Rc3 or B6 males at the night (one couple per cage) and the next day females with a vaginal plug were isolated. Oocytes were collected from ampullae of oviducts and freed from the cumulus cells by brief incubation at 37 °C with hyaluronidase (Sigma, St. Louis, MO, USA) in M2 medium (Sigma). Oocytes were rinsed and kept in M2 medium in a humidified 5% CO₂

atmosphere at 37 °C before mounting. The number of fertilized oocytes was evaluated using DAPI immune-fluorescent staining to visualize the DNA.

4.5. *In Vitro Fertilization Assays*

Oocytes Preparation: Five week-old B6 females were injected with 5 IU of PMSG (pregnant mare's serum gonadotrophin; Intervet, France) followed by 5 IU of hCG (human chorionic gonadotrophin; Intervet) 48 h later. After super-ovulation, cumulus-oocyte complexes were collected from ampullae of oviducts about 14 h after hCG injection. Oocytes were freed from the cumulus cells by 3–5 min of incubation at 37 °C with hyaluronidase (Sigma) in M2 medium (Sigma). Oocytes were rinsed and kept in Ferticult medium (FertiPro, Belgium) at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere under mineral oil (Sigma). Zona pellucida was then dissolved with acidic Tyrode's (AT) solution (pH 2.5, Sigma) under visual monitoring. The zona-free eggs were rapidly washed in medium and kept at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere for 2 to 3 h to recover their fertilizability.

Sperm preparation: Mouse spermatozoa were collected from the caudae epididymis of 8–13-week-old B6 and Rc3 males and capacitated at 37 °C under 5% CO₂ for 90 min in a 500 µl drop of Ferticult medium supplemented with 3% BSA (Sigma), under mineral oil.

In Vitro Fertilization: Zona-free eggs were inseminated with capacitated sperm for 3 h in a 100 µl drop of Ferticult 3% BSA medium at a final concentration of 10⁵/mL or 10⁶/mL when the aim was to try to recover fertilizing ability of Rc3 sperm by concentrating it ten times. Then, they were washed and directly mounted in Vectashield/DAPI (Vector laboratories, CA, USA) for microscopy observation. The oocytes were considered fertilized when they showed at least one fluorescent decondensed sperm head within their cytoplasm.

4.6. *Assessment of Sperm Acrosome Reaction*

Freshly recovered or capacitated sperm were washed in PBS containing 1% BSA, centrifuged at 300× g for 5 min and immediately fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in PBS with 1% BSA at 4 °C for 1 h. In order to detect the sperm acrosomal status, after washing, the fixed spermatozoa were treated for 30 min in 95% ethanol at 4 °C, washed by centrifugation through PBS and stained with FITC-conjugated lectin PSA (25 µg/mL in PBS) for 10 min. Nuclei were stained with DAPI (blue). After repeated washing with double distilled water, a drop of sperm suspension was smeared on a slide, air-dried, and mounted with Vectashield. Detection was performed using a Nikon Eclipse E600 microscope Zeiss Axiophot epifluorescence microscope and images were digitally acquired with a camera (Coolpix 4500, Nikon).

4.7. *Transmission Electron Microscopy Analysis of Sperm Cells*

Mouse spermatozoa from three different males were prepared as described above (in vitro fertilization) and fixed by incubation in PBS supplemented with 2% glutaraldehyde (Grade I, Sigma) for 2 h at room temperature. Samples were washed twice in PBS and post-fixed by incubation with 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences), after which they were dehydrated by immersion in a graded series of alcohol solutions and embedded in Epon resin (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA). Ultra-thin sections (90 nm) were cut with a Reichert Ultracut S ultramicrotome (Reichert-Jung AG, Wien, Austria) and were then stained with uranyl acetate and lead citrate. Sections were analyzed with a JEOL 1011 microscope and digital images were acquired with a Gatan Erlangshen CCD camera and Digital Micrograph software. The integrity of sperm organelles was checked including the acrosome, nucleus, flagellum, etc. Acrosomes with a space between the nuclear membrane and the inner acrosomal membrane were considered abnormal. Acrosomes with membranes in close contact were considered normal. The presence of residual bodies, cytoplasmic leftovers, was recorded.

4.8. Digital and Bibliographic Tools Used to Shorten the List of Candidate Genes

Databases were searched for the presence of genic sequences including UCSC GenomeBrowser (genome.ucsc.edu), Ensembl (www.ensembl.org), and NCBI Gene (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene). The nature of these sequences was reported as protein coding gene, processed transcript, pseudogene, or non coding RNA, although some discrepancies exist between databases. The RNA expression level was searched in the BioGPS (biogps.org) and NCBI Gene databases, in mouse and in human when available. Results from antibody labelling on human tissues were obtained from ProteinAtlas (proteinatlas.org). Data relative to mouse knock-out models and human diseases were collected from the Mouse Genome Informatics website (www.informatics.jax.org). Protein function was obtained from the Gene Ontology website (www.geneontology.org). SNPs were retrieved from the Mouse Genomes Project (www.sanger.ac.uk/sanger/Mouse_SnpViewer) and MGI databases. All analyses were done on the GRCm38 version of the mouse genome.

4.9. Suspension Cell Sorting

Testis cells from 2-month-old B6 mice were obtained as described previously [40]. The testis albuginea was removed and seminiferous tubules were dissociated using enzymatic digestion by collagenase type I at 100 u/mL for 15 min at 32 °C in HBSS supplemented with 20 mM HEPES pH 7.2, 1.2 mM MgSO₄ 7H₂O, 1.3 mM CaCl₂ 2H₂O, 6.6 mM sodium pyruvate, and 0.05% lactate. After an HBSS wash and centrifugation, the pelleted tubules were further incubated in cell dissociation buffer (Invitrogen) for 25 min at 32 °C. The resulting whole cell suspension was successively filtered through a 40 µm then 20 µm nylon mesh to remove cell clumps. After an HBSS wash, the cell pellet was resuspended in incubation buffer (HBSS supplemented with 20 mM HEPES pH 7.2, 1.2 mM MgSO₄ 7H₂O, 1.3 mM CaCl₂ 2H₂O, 6.6 mM sodium pyruvate, 0.05% lactate, glutamine and 1% fetal calf serum) and stained with Hoechst 33,342 (5 µg/mL) for 1 h at 32 °C in a water bath. Cells were then labeled with monoclonal antibodies (1 µg per 10⁶ cells) from BD Pharmingen: anti-c-Kit-biotin (2B8), and anti-α-6 integrin-PE (GoH3). The cell sorting was performed on ARIA (Becton Dickinson).

4.10. RNA Extraction and Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. After RNA preparation, total RNA was treated with DNase I (Invitrogen Life Technologies) for 10 min at room temperature followed by inactivation with EDTA (Sigma). Total RNA was reverse transcribed to obtain cDNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's protocols. Quantitative PCR was carried out using the fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) and a real time PCR system (Light Cycler 1.5, Roche Diagnostics, Division Applied Sciences, Meylan, France) according to standard PCR conditions. To validate the primers used in qRT-PCR, four pairs of primers were tested for each candidate gene and reference gene. For quantitative calculations, values were normalized to mouse Cyclophilin A expression.

4.11. Statistical Analysis

Results are expressed as mean ±SEM of at least three independent experiments. For statistical analysis, one-way ANOVA multiple comparisons test or t-Test were performed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows, (GraphPad Software, La Jolla California USA). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8506/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, A.Z., S.B., X.M. and D.V.; methodology, M.V., M.-S.G., V.F., C.M. and C.I.-R. validation, A.Z., S.B. and M.-S.G.; formal analysis, A.Z. and S.B.; data curation, M.V. and S.B.; writing—original draft preparation, A.Z.; S.B. and M.V.; writing—review and editing, A.Z. and S.B.; visualization, A.Z., M.V. and S.B.; supervision, A.Z.; funding acquisition, A.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université de Paris.

Acknowledgments: We thank C. Serres for scientific discussions, the staff of the animal facility of Institut Pasteur (Paris) for the IRCS breeding and A. Schmitt from the Plateforme imagerie: Microscopie Electronique of the Cochin Institute (Paris) for his technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

Abbreviations

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
sAR	Spontaneous acrosome reaction
AR	Acrosome reaction
QTL	Quantitative trait locus
IRCS	Recombinant interspecific congenic strain
IVF	In vitro fertilization
KO	Knockout
<i>Mafq1</i>	Male fertility QTL chromosome 1

References

- Matzuk, M.M.; Lamb, D.J. The biology of infertility: Research advances and clinical challenges. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 1197–1213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Uhlen, M.; Fagerberg, L.; Hallstrom, B.M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, A.; Kampf, C.; Sjostedt, E.; Asplund, A.; et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **2015**, *347*, 1260419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cooke, H.J.; Saunders, P.T. Mouse models of male infertility. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 790–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Borg, C.L.; Wolksi, K.M.; Gibbs, G.M.; O'Bryan, M.K. Phenotyping male infertility in the mouse: How to get the most out of a “non-performer”. *Hum. Reprod. Update* **2010**, *16*, 205–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Burgio, G.; Szatanik, M.; Guenet, J.L.; Arnau, M.R.; Panthier, J.J.; Montagutelli, X. Interspecific recombinant congenic strains between C57BL/6 and mice of the *Mus spretus* species: A powerful tool to dissect genetic control of complex traits. *Genetics* **2007**, *177*, 2321–2333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- L'Hote, D.; Laissue, P.; Serres, C.; Montagutelli, X.; Veitia, R.A.; Vaiman, D. Interspecific resources: A major tool for quantitative trait locus cloning and speciation research. *Bioessays* **2010**, *32*, 132–142. [[CrossRef](#)]
- L'Hote, D.; Serres, C.; Veitia, R.A.; Montagutelli, X.; Oulmouden, A.; Vaiman, D. Gene expression regulation in the context of mouse interspecific mosaic genomes. *Genome Biol.* **2008**, *9*, R133. [[CrossRef](#)]
- L'Hote, D.; Vatin, M.; Auer, J.; Castille, J.; Passet, B.; Montagutelli, X.; Serres, C.; Vaiman, D. Fidgetin-like1 is a strong candidate for a dynamic impairment of male meiosis leading to reduced testis weight in mice. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27582. [[CrossRef](#)]
- Vatin, M.; Burgio, G.; Renault, G.; Laissue, P.; Firlej, V.; Mondon, F.; Montagutelli, X.; Vaiman, D.; Serres, C.; Ziyat, A. Refined mapping of a quantitative trait locus on chromosome 1 responsible for mouse embryonic death. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43356. [[CrossRef](#)]
- Laissue, P.; Lakhal, B.; Vatin, M.; Batista, F.; Burgio, G.; Mercier, E.; Santos, E.D.; Buffat, C.; Sierra-Diaz, D.C.; Renault, G.; et al. Association of FOXD1 variants with adverse pregnancy outcomes in mice and humans. *Open Biol.* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)]
- Vatin, M.; Bouvier, S.; Bellazi, L.; Montagutelli, X.; Laissue, P.; Ziyat, A.; Serres, C.; De Mazancourt, P.; Dieudonné, M.N.; Mornet, E.; et al. Polymorphisms of human placental alkaline phosphatase are associated with in vitro fertilization success and recurrent pregnancy loss. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 362–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Vatin, M.; Bouvier, S.; Bellazzi, L.; Laissue, P.; Burguio, G.; Montagutelli, X.; Serres, C.; Ziyat, A.; Mornet, E.; Gris, J.C.; et al. Pregnancy failure and alkaline phosphatases: From mouse genetics to human disease. *Bull. Group Int. Rech. Sci. Stomatol. Odontol.* **2012**, *51*, e30.
13. Yuan, J.; Chen, J. FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 10640–10645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kim, D.H.; Ko, D.S.; Lee, H.C.; Lee, H.J.; Park, W.I.; Kim, S.S.; Park, J.K.; Yang, B.C.; Park, S.B.; Chang, W.K.; et al. Comparison of maturation, fertilization, development, and gene expression of mouse oocytes grown in vitro and in vivo. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2004**, *21*, 233–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Barbaux, S.; Ialy-Radio, C.; Chalbi, M.; Dybal, E.; Homps-Legrand, M.; Do Cruzeiro, M.; Vaiman, D.; Wolf, J.P.; Ziyat, A. Sperm SPACA6 protein is required for mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5335. [[CrossRef](#)]
16. Valdivia, M.; Sillerico, T.; De Ioannes, A.; Barros, C. Proteolytic activity of rabbit perivitelline spermatozoa. *Zygote* **1999**, *7*, 143–149. [[CrossRef](#)]
17. Clift, L.E.; Andrlíkova, P.; Frolíkova, M.; Stopka, P.; Bryja, J.; Flanagan, B.F.; Johnson, P.M.; Dvorakova-Hortova, K. Absence of spermatozoal CD46 protein expression and associated rapid acrosome reaction rate in striped field mice (*Apodemus agrarius*). *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2009**, *7*, 29. [[CrossRef](#)]
18. Sebkova, N.; Ded, L.; Vesela, K.; Dvorakova-Hortova, K. Progress of sperm IZUMO1 relocation during spontaneous acrosome reaction. *Reproduction* **2014**, *147*, 231–240. [[CrossRef](#)]
19. Wisner, A.; Sachar, S.; Ghetler, Y.; Shulman, A.; Breitbart, H. Assessment of sperm hyperactivated motility and acrosome reaction can discriminate the use of spermatozoa for conventional in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection: Preliminary results. *Andrologia* **2014**, *46*, 313–315. [[CrossRef](#)]
20. Efrat, M.; Stein, A.; Pinkas, H.; Breitbart, H.; Unger, R.; Birk, R. Paraoxonase 1 (PON1) attenuates sperm hyperactivity and spontaneous acrosome reaction. *Andrology* **2019**, *7*, 24–30. [[CrossRef](#)]
21. Inoue, N.; Ikawa, M.; Nakanishi, T.; Matsumoto, M.; Nomura, M.; Seya, T.; Okabe, M. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol. Cell Biol.* **2003**, *23*, 2614–2622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Crapster, J.A.; Rack, P.G.; Hellmann, Z.J.; Le, A.D.; Adams, C.M.; Leib, R.D.; Elias, J.E.; Perrino, J.; Behr, B.; Li, Y.; et al. HIPK4 is essential for murine spermiogenesis. *Elife* **2020**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Liu, C.; Song, Z.; Wang, L.; Yu, H.; Liu, W.; Shang, Y.; Xu, Z.; Zhao, H.; Gao, F.; Wen, J.; et al. Sirt1 regulates acrosome biogenesis by modulating autophagic flux during spermiogenesis in mice. *Development* **2017**, *144*, 441–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Harbuz, R.; Zouari, R.; Pierre, V.; Ben Khelifa, M.; Kharouf, M.; Coutton, C.; Merdassi, G.; Abada, F.; Escoffier, J.; Nikas, Y.; et al. A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am. J. Hum. Genet.* **2011**, *88*, 351–361. [[CrossRef](#)]
25. Pierre, V.; Martinez, G.; Coutton, C.; Delaroche, J.; Yassine, S.; Novella, C.; Pernet-Gallay, K.; Hennebicq, S.; Ray, P.F.; Arnoult, C. Absence of Dpy19L2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development* **2012**, *139*, 2955–2965. [[CrossRef](#)]
26. Ye, S.J.; Ying, L.; Ghosh, S.; de Franca, L.R.; Russell, L.D. Sertoli cell cycle: A re-examination of the structural changes during the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. *Anat. Rec.* **1993**, *237*, 187–198. [[CrossRef](#)]
27. Berruti, G.; Perego, L.; Martegani, E. Molecular cloning and developmental pattern of expression of MSJ-1, a new male germ cell-specific DNAJ homologue. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *444*, 145–150. [[CrossRef](#)]
28. Meccariello, R.; Cobellis, G.; Berruti, G.; Junier, M.P.; Ceriani, M.; Boilee, S.; Pierantoni, R.; Fasano, S. Mouse sperm cell-specific DnaJ first homologue: An evolutionarily conserved protein for spermiogenesis. *Biol. Reprod.* **2002**, *66*, 1328–1335. [[CrossRef](#)]
29. Meccariello, R.; Berruti, G.; Chianese, R.; De Santis, R.; Di Cunto, F.; Scarpa, D.; Cobellis, G.; Zucchetti, I.; Pierantoni, R.; Altruda, F.; et al. Structure of msj-1 gene in mice and humans: A possible role in the regulation of male reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2008**, *156*, 91–103. [[CrossRef](#)]
30. Abu-Farha, M.; Cherian, P.; Al-Khairi, I.; Tiss, A.; Khadir, A.; Kavalakatt, S.; Warsame, S.; Dehbi, M.; Behbehani, K.; Abubaker, J. DNAJB3/HSP-40 cochaperone improves insulin signaling and enhances glucose uptake in vitro through JNK repression. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14448. [[CrossRef](#)]

31. Boillee, S.; Berruti, G.; Meccariello, R.; Grannec, G.; Razan, F.; Pierantoni, R.; Fasano, S.; Junier, M.P. Early defect in the expression of mouse sperm DNAJ 1, a member of the DNAJ/heat shock protein 40 chaperone protein family, in the spinal cord of the wobbler mouse, a murine model of motoneuronal degeneration. *Neuroscience* **2002**, *113*, 825–835. [[CrossRef](#)]
32. Gaasch, J.A.; Bolwahn, A.B.; Lindsey, J.S. Hepatocyte growth factor-regulated genes in differentiated RAW 264.7 osteoclast and undifferentiated cells. *Gene* **2006**, *369*, 142–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mitsugi, R.; Itoh, T.; Fujiwara, R. Expression of Human DNAJ (Heat Shock Protein-40) B3 in Humanized UDP-glucuronosyltransferase 1 Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 14997–15008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Berruti, G.; Martegani, E. The deubiquitinating enzyme mUBPy interacts with the sperm-specific molecular chaperone MSJ-1: The relation with the proteasome, acrosome, and centrosome in mouse male germ cells. *Biol. Reprod.* **2005**, *72*, 14–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Arredouani, A.; Diane, A.; Khattab, N.; Bensmail, I.; Aoude, I.; Chikri, M.; Mohammad, R.; Abou-Samra, A.B.; Dehbi, M. DNAJB3 attenuates metabolic stress and promotes glucose uptake by eliciting Glut4 translocation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4772. [[CrossRef](#)]
36. Van De Weghe, J.C.; Rusterholz, T.D.S.; Latour, B.; Grout, M.E.; Aldinger, K.A.; Shaheen, R.; Dempsey, J.C.; Maddirevula, S.; Cheng, Y.H.; Phelps, I.G.; et al. Mutations in ARMC9, which Encodes a Basal Body Protein, Cause Joubert Syndrome in Humans and Ciliopathy Phenotypes in Zebrafish. *Am. J. Hum. Genet.* **2017**, *101*, 23–36. [[CrossRef](#)]
37. Brownlow, S.; Webster, R.; Croxson, R.; Brydson, M.; Neville, B.; Lin, J.P.; Vincent, A.; Newsom-Davis, J.; Beeson, D. Acetylcholine receptor delta subunit mutations underlie a fast-channel myasthenic syndrome and arthrogryposis multiplex congenita. *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 125–130. [[CrossRef](#)]
38. Shen, X.M.; Fukuda, T.; Ohno, K.; Sine, S.M.; Engel, A.G. Congenital myasthenia-related AChR delta subunit mutation interferes with intersubunit communication essential for channel gating. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1867–1876. [[CrossRef](#)]
39. Shen, X.M.; Ohno, K.; Fukudome, T.; Tsujino, A.; Brengman, J.M.; De Vivo, D.C.; Packer, R.J.; Engel, A.G. Congenital myasthenic syndrome caused by low-expressor fast-channel AChR delta subunit mutation. *Neurology* **2002**, *59*, 1881–1888. [[CrossRef](#)]
40. Lassalle, B.; Bastos, H.; Louis, J.P.; Riou, L.; Testart, J.; Dutrillaux, B.; Fouchet, P.; Allemand, I. ‘Side Population’ cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *SO Dev.* **2004**, *131*, 479–487. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

V. Article N°2

Deletion of the Spata3 Gene Induces Sperm Alterations and In Vitro Hypofertility in Mice

Publié dans *International Journal of Molecular Sciences* (IJMS) le 16 Février 2021

Marie-Sophie Girault, Sophie Dupuis*, Côme Ialy-Radio, Laurence Stouvenel, Cécile Viollet, Rémi Pierre, Maryline Favier, Ahmed Ziyat et Sandrine Barbaux*

*These authors contributed equally to this work.

DOI : 10.3390/ijms22041959



Article

Deletion of the *Spata3* Gene Induces Sperm Alterations and In Vitro Hypofertility in Mice

Marie-Sophie Girault ^{1,†}, Sophie Dupuis ^{1,†}, Côme Ialy-Radio ¹, Laurence Stouvenel ¹, Cécile Viollet ¹, Rémi Pierre ¹, Maryline Favier ¹, Ahmed Ziyat ^{1,2,†}  and Sandrine Barbaux ^{1,*},†

- ¹ Institut Cochin, Université de Paris, INSERM, CNRS, F-75014 Paris, France; marie-sophie.girault@inserm.fr (M.-S.G.); sophie.dupuis@inserm.fr (S.D.); come.ialy-radio@inserm.fr (C.I.-R.); laurence.stouvenel@inserm.fr (L.S.); violletcecile@gmail.com (C.V.); remi.pierre@inserm.fr (R.P.); maryline.favier@inserm.fr (M.F.); aziyyat@yahoo.fr (A.Z.)
- ² Service d'Histologie, d'Embryologie, Biologie de la Reproduction, AP-HP, Hôpital Cochin, F-75014 Paris, France
- * Correspondence: sandrine.barbaux@inserm.fr
- † These authors contributed equally to this work. M.-S.G. and S.D. are co-first authors; A.Z. and S.B. are co-last authors.

Abstract: Thanks to the analysis of an Interspecific Recombinant Congenic Strain (IRCS), we previously defined the *Mafq1* quantitative trait locus as an interval on mouse Chromosome 1 associated with male hypofertility and ultrastructural abnormalities. We identified the Spermatogenesis associated protein 3 gene (*Spata3* or *Tsarg1*) as a pertinent candidate within the *Mafq1* locus and performed the CRISPR-Cas9 mediated complete deletion of the gene to investigate its function. Male mice deleted for *Spata3* were normally fertile in vivo but exhibited a drastic reduction of efficiency in in vitro fertilization assays. Mobility parameters were normal but ultrastructural analyses revealed acrosome defects and an overabundance of lipids droplets in cytoplasmic remnants. The deletion of the *Spata3* gene reproduces therefore partially the phenotype of the hypofertile IRCS strain.

Keywords: *Spata3*; infertility; acrosome; spermatogenesis; sperm; mouse model; lipid droplets



Citation: Girault, M.-S.; Dupuis, S.; Ialy-Radio, C.; Stouvenel, L.; Viollet, C.; Pierre, R.; Favier, M.; Ziyat, A.; Barbaux, S. Deletion of the *Spata3* Gene Induces Sperm Alterations and In Vitro Hypofertility in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1959. <https://doi.org/10.3390/ijms22041959>

Academic Editor: Donato Gemmati
Received: 15 January 2021
Accepted: 12 February 2021
Published: 16 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Genes necessary for testis function, particularly in post-meiotic germ cells, are extremely numerous [1]. However, the function and character of dispensability of these genes is only partially known. Their responsibility in clinical cases of human male infertility is therefore also only partially deciphered.

For example, globozoospermia, a very rare form of male infertility characterized by round-shaped sperm heads that present a complete lack or an abnormal setup of their acrosome, can be explained by alterations of the *DPY19L2* gene in about 60% of reported cases [2,3]. Some rare case reports have also revealed mutations of the *SPATA16*, *ZPBP1* and *PICK1* genes [4–6]. But the defect responsible for some remaining clinical cases is not yet identified and the biogenesis of the acrosome is still not completely elucidated. Animal models can help with suggesting some other genes involved in the process.

Recently, we reported the analysis of a mouse model exhibiting a phenotype of spermatogenesis alterations including anomalies of the acrosome. We identified in an Interspecific Recombinant Congenic Strain (IRCS) a region of mouse chromosome 1 whose presence in a *Mus spretus* version within a *Mus musculus domesticus* (C57Bl/6) background is associated with signs reminiscent of globozoospermia. This quantitative trait locus (QTL), named *Mafq1* for male fertility QTL chromosome 1, is associated with an interval of approximately 4 Mb between markers *D1Mit438* and *D1Mit305* [7].

This specific interval contains more than 70 coding genes. Among them, we concentrated our research on the *Spata3* gene (Spermatogenesis associated protein 3, also known

as Testis and Spermatogenesis cell Apoptosis Related Gene 1 or *Tsarg1*) [8,9]. We consider it as one of the best candidates to explain the hypofertility phenotype of the Rc3 strain, on the basis of various arguments.

Spata3 is expressed specifically in the testis both in mice and humans. Precisely, its expression can be detected during spermatogenesis from the round spermatid stage to mature sperm [7]. *Spata3* is conserved in many mammalian species, with mouse and human proteins sharing 55% of their identity.

No data are available on the function of the SPATA3 protein, the SPATA family being a catalogue of proteins sharing an expression in the testis without any similarity of sequence neither function. Furthermore, no specific functional domain can be predicted from its sequence and no mouse model is available to determine its role. However, the human SPATA3 gene has been reported to be among the most down-regulated genes in the testis of infertile men diagnosed with nonobstructive azoospermia [10]. Rare variants of this gene were also associated with prostate cancer [11].

Comparison of the sequence of the *Spata3* gene between the *Mus spretus* and the C57Bl/6 versions highlights many variations: 14 missense changes in the different isoforms and at least 16 UTR variants (Table S1). These variations could be responsible for important modifications of the structure and/or the function of the *spretus* SPATA3 protein compared to the C57Bl/6 version. This *spretus* version of the protein could therefore be inapt to interact/bind/function with any receptor/cofactor/partner in the C57Bl/6 version in the IRCS model to accomplish its normal activity, resulting in the hypofertility phenotype observed in the Rc3 IRCS male mice [7].

We therefore decided to produce a mouse line invalidated for the *Spata3* gene in order to decipher the function of this gene. Though male mice lacking *Spata3* expression are fully fertile in vivo, their fertility in vitro is drastically affected and some ultrastructural anomalies can be observed in sperm samples.

2. Results

2.1. *Spata3* Is Expressed in Sperm and Localized on the Acrosome

We used a specific antibody to detect SPATA3 in testis slides. SPATA3 is expressed from the round spermatid stage to mature sperm. It is specifically localized at the acrosome region (Figure 1a–d). No signal was obtained when secondary antibody was used alone (Figure 1e,f). We also confirmed its presence at the mRNA level by RT-PCR, as shown in Figure 2b. Quantitative single-cell RNA sequencing analyses confirm a germ-cell specific expression from the round spermatid stage in humans and mice (Reprogenomics Viewer) [12,13].

2.2. *Spata3* Gene Deleted Male Mice Are Fertile In Vivo

Mice invalidated for the *Spata3* gene were generated by microinjecting embryos with RNA guides targeting upstream of the first coding exon (exon 1bis) and downstream of the last coding exon (exon 3) (Figure 2a). Two different though very similar lines encompassing an 8547 nt deletion and an 8507 nt deletion of the gene locus, respectively, were selected and maintained. Identification of animals presenting a deletion of *Spata3* was obtained by PCR amplification and sequencing of the locus as illustrated in Figure 2c. Different crossings were performed to produce homozygous knock-out animals (KO). Females *Spata3* KO were normally fertile. As the antibody previously used for immunofluorescence detection (Figure 1) is no longer commercialized and no other validated antibody is available for Western blotting, the absence of expression of the *Spata3* gene could only be checked by RT-PCR. No amplification of *Spata3* could be observed in the testis of KO males compared to wild-type (WT) samples whereas the cDNA of a testis-specific gene, *Prm1*, could be detected in both samples (Figure 2b) [14]. *Spata3* KO males exhibited a normal sexual behavior and after mating with WT females, could sire offspring (Figure 3a). The average litter size was not different when pups were born from KO males (7.1 ± 0.9 ; $n = 9$) or from WT males (6.7 ± 0.5 ; $n = 10$, $p = 0.71$). This result suggests that in vivo the *Spata3* gene is

dispensable for sperm function and fertility. Similar results were obtained with the two KO strains but only one representative strain is shown.

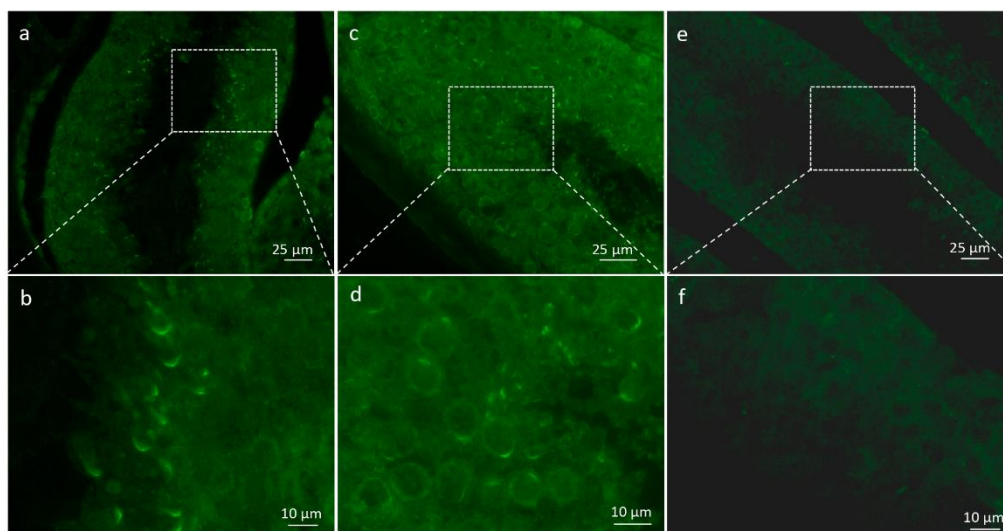


Figure 1. Presence of SPATA3 at the acrosome level. (a,c) Immunostaining for SPATA3 detection. (e) shows negative control using secondary antibody alone and (b,d,f) show a higher magnification of regions framed in (a,c,e), respectively.

2.3. *Spata3* Gene Deleted Male Mice Have a Reduced Fertility In Vitro

In vitro fertilization assays were set up to further analyze the sperm quality. The fertilization rate (FR: number of fertilized oocytes among the total) of cumulus-intact WT oocytes was $34.9 \pm 3.9\%$ ($n = 147$) when WT sperm was used and $7.3 \pm 2.1\%$ ($n = 150$) when the sperm was obtained from KO males ($p < 0.0001$) (Figure 3b). When zona-free oocytes from WT females were inseminated with sperm from WT or KO males, the fertilization index (FI: the average number of fused sperms per oocyte) was 0.92 ± 0.06 ($n = 108$) and 0.35 ± 0.04 ($n = 118$), respectively ($p < 0.0001$) (Figure 3c). These observations confirm that *Spata3* is not essential for in vivo fertilization but that in vitro, its absence affects the successful process of fertilization.

2.4. Sperm from *Spata3* Gene Deleted Male Mice Have Structural Anomalies

In order to identify why sperm from *Spata3* KO mice were not as efficient to fertilize in vitro, we decided to characterize it. Histology of the testes of KO males showed no abnormalities (Figure 4a). Observation of sperm under a light microscope failed to show any obvious defect (Figure 4b). Counts from epididymal sperm were not different between WT and KO males (Figure 4c). Similarly, spontaneous acrosome reaction occurred at the same level in WT and KO males after sperm capacitation (Figure 4d). Analyses using the Computer Aided Sperm Analysis (CASA) system did not reveal any difference between the control and KO sperm for any parameters, including curvilinear velocity (VCL), beat/cross frequency (BCF) and amplitude of lateral head displacement (ALH), as shown in Figure 4e,f.

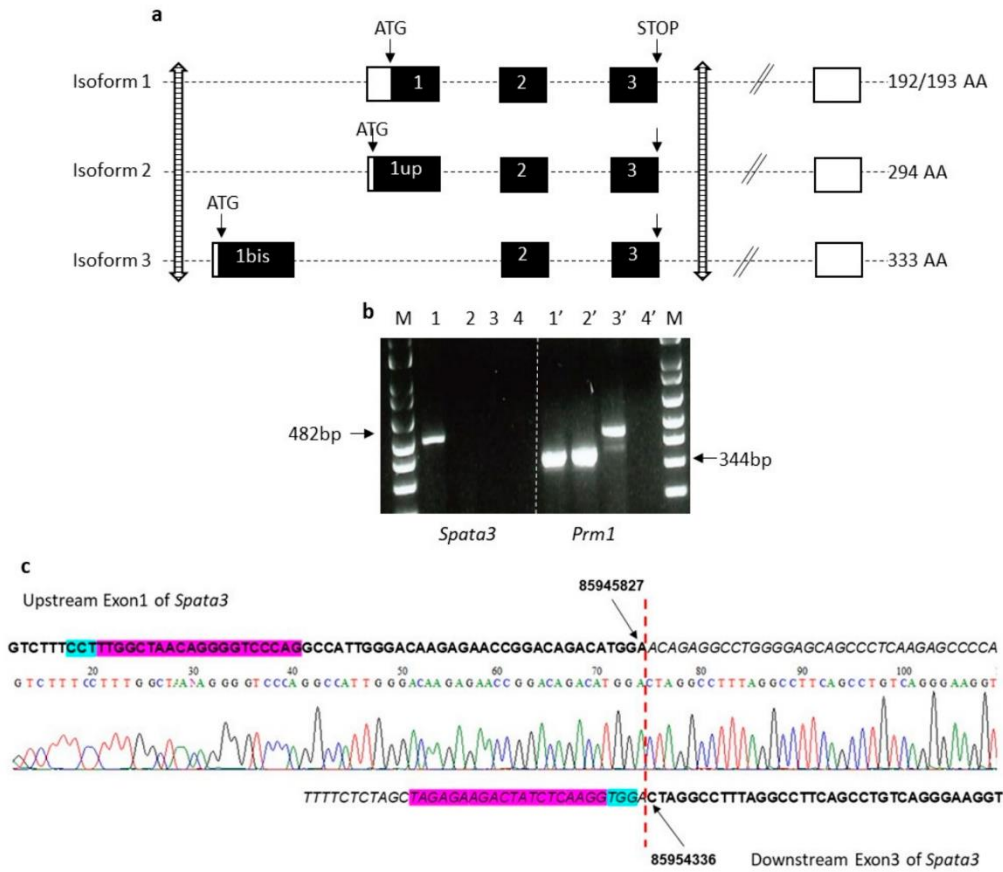


Figure 2. Strategy of deletion of the mouse *Spata3* gene. (a). Map of the mouse *Spata3* gene locus. The organization of the mouse *Spata3* gene is represented with the main exons (coding in black boxes, non-coding in white boxes). Isoforms 1, 2 and 3 represent the major isoforms. The position of the sites targeted by RNA guides is marked by striped arrows. Genome version GRCm38.p6. (b). Expression of *Spata3* and *Prm1* genes in testis samples. 1 and 1', wild-type (WT) cDNA; 2 and 2', knock-out animals (KO) cDNA; 3 and 3', WT genomic DNA; 4 and 4', negative control; M, molecular weight marker. (c). Chromatogram of the deletion site including alignment with the WT sequence. The RNA guides are in purple and the PAM sites in blue. The positions of deletion sites are indicated.

Sperm samples were analyzed by electronic microscopy in order to reveal subtle morphological and ultrastructural defects that could not be visible through light microscopy and that could explain the in vitro hypofertility phenotype. Some abnormal sperm could be observed, while the acrosome seemed to be partially or completely detached from the nucleus. In some extreme cases, sperm could also look “inflated”, showing an asymmetrical acrosome, completely untied from the nucleus, as exemplified in Figure 5a. A count of this particular phenotype revealed a greater abundance in KO (15%) compared to WT (3%) samples (Figure 5c). Some other sperm showed only one or the other defect, that were not considered in the previous quantitative evaluation.

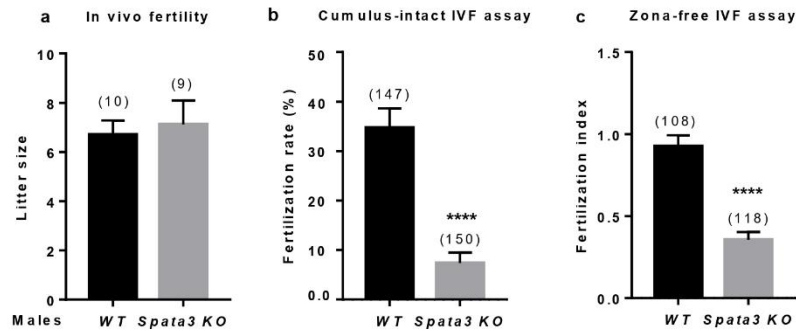


Figure 3. Evaluation of *Spata3* KO male fertility. (a). Evaluation of in vivo fertility. WT females were mated with WT or KO males to evaluate their capacity to fertilize in vivo. After an overnight mating, vaginal plugs were checked. Litter size was counted after 3 weeks of gestation. Mean litter size \pm SEM. Numbers between brackets indicate the numbers of litters. (b). Evaluation of in vitro fertility. The fertilization rate (or mean percentage \pm SEM of fertilized eggs) was assessed by cumulus-intact IVF assay at 10^6 (WT and KO) sperm per ml. It was decreased between oocytes inseminated by KO sperm compared to WT. Numbers between brackets indicate the numbers of oocytes. (c). Evaluation of in vitro fertility. The fertilization index (or mean \pm SEM of sperm number fused by egg) was assessed by zona-free IVF assay at 10^5 (WT or KO) sperm per ml. It was decreased between oocytes inseminated by KO sperm compared to WT. Numbers between brackets indicate the numbers of oocytes. Experiments were repeated at least three times. **** $p < 0.0001$.

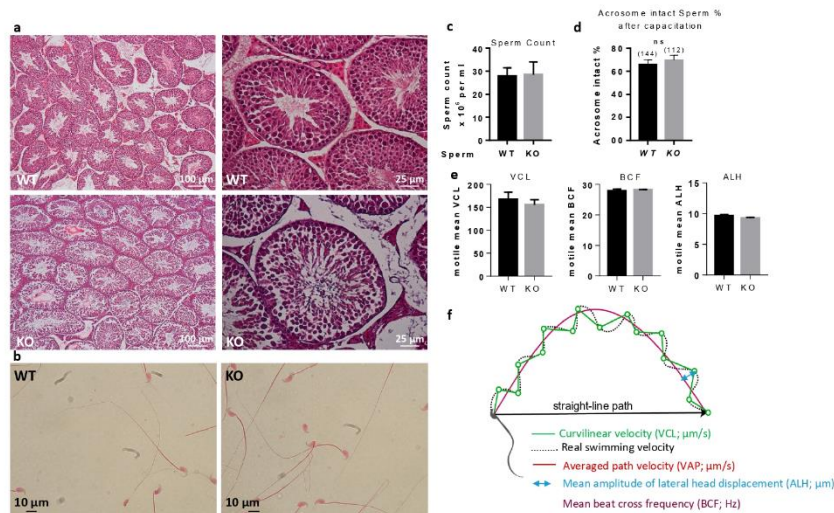


Figure 4. Histology of sperm and testes. (a). Adult testes were fixed in paraformaldehyde, sliced and colored with hematoxylin-eosin. (b). Papanicolaou staining of WT and KO sperm. (c). Sperm counts of WT and KO sperm. (d). Spontaneous acrosome reaction counting. There is no difference between WT and KO sperm in terms of acrosome reaction after capacitation. ns, not significant. (e). Analyses of sperm parameters by CASA. CASA analyzes of sperm movement parameters from *Spata3* deleted mice showed no difference in comparison to those of WT sperm. As an example, here are presented: curvilinear velocity (VCL), beat/cross frequency (BCF) and amplitude of lateral head displacement (ALH). Data are represented as the mean \pm SEM of at least three sperm samples from males of each group. (f). Schematic representation of CASA measurements.

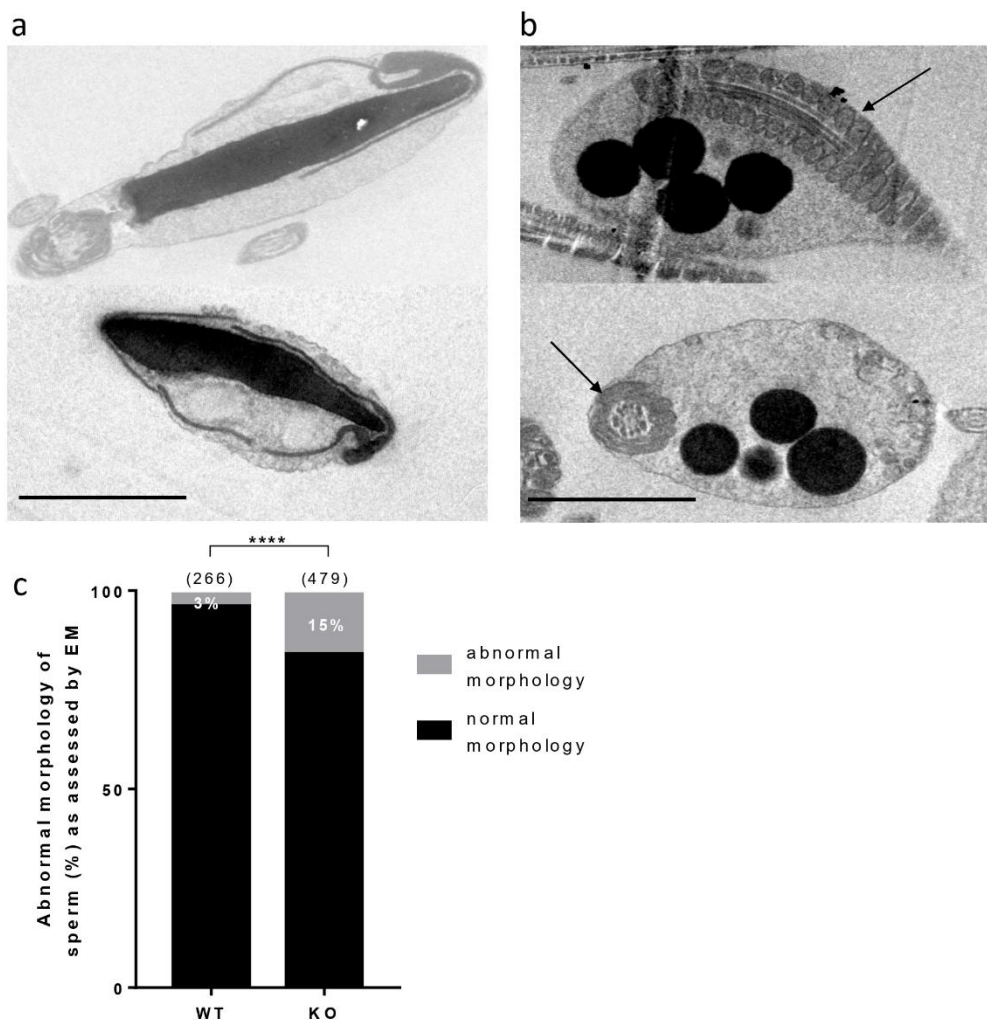


Figure 5. Electronic microscopy analysis of sperm. (a). Examples of abnormal sperm heads combining an “inflated” aspect, a detached and asymmetrical acrosome. (b). Examples of lipid droplets present in cytoplasmic bodies. The arrows indicate the presence of mitochondria within the flagellum. The scale bars represent 2 μm . (c). Counting of sperm showing the specific phenotype exemplified in panel a, among all observed spermatic heads, between WT and KO samples. Numbers between brackets indicate the numbers of sperm heads. **** $p < 0.0001$.

In addition, some dark droplets were visible, more frequently in KO compared to WT samples (Figure 5b). These droplets, suspected to contain lipids, are present within cytoplasmic remnants located around the midpiece of the flagellum, as attested to by the nearby presence of mitochondria.

In order to better characterize a putative metabolic defect resulting in such droplets, we used an Oil Red O staining on WT and KO sperm (Figure 6a). Up to 13.4% and 9.4% of KO sperm were positive for lipid droplets, before and after capacitation, respectively, whereas less than 0.5% of WT sperm presented staining in both conditions (Figure 6b).

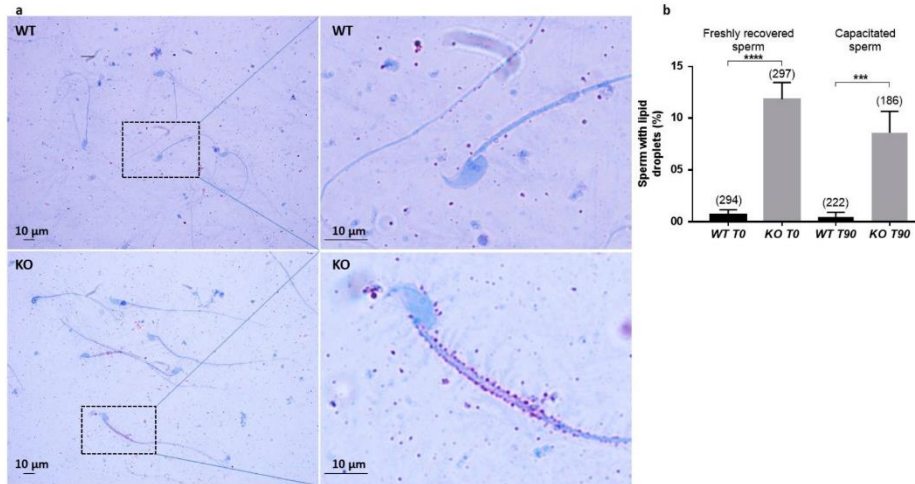


Figure 6. Lipid detection by Oil Red O staining. (a). Light microscopy detection of lipid droplets after Oil Red O staining. Right panels show higher magnification of regions framed in left panels. (b). Counting of sperm positive for lipid droplets after staining, before (T0) or after (T90) capacitation. Numbers between brackets indicate the counted sperm; *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$.

3. Discussion

In order to understand which gene within the *Mafq1* QTL interval was responsible for the hypofertility phenotype observed in the Rc3 IRCS mice [7], we explored the list of candidate genes present in the interval. *Spata3* matched all potential criterion of selection: the specific expression profile, regarding both the timing and location in differentiating sperm cells, the evolutionary conservation, the high number and predicted impact of missense changes between B6 and *spretus* SPATA3 proteins. The lack of information about its function left all hypotheses open. We therefore decided to generate a *Spata3* null mouse to determine if the invalidation of the *Spata3* gene could mimic the phenotype of the Rc3 IRCS mouse.

When this project was initiated, the reported structure of the *Spata3* gene was the one reproduced in Figure 2a, as isoform 1, including 3 coding exons (Exons 1, 2 and 3) and additional variable 3'UTR exons. A CRISPR/Cas9 strategy had been developed to target and affect exon 1 with RNA guides, therefore compromising the full ORF. Two independent KO lines were produced but they were found to be fully fertile in vivo (data not shown).

However, in 2018, databases revealed the existence of so far unsuspected isoforms of the gene. First, an additional isoform starts upstream of the reported translation start, at an ATG located 303 bp earlier, in phase (“exon 1 upstream”, Figure 2a, isoform 2). Second, a new alternative isoform includes a new upstream first exon (“exon 1 bis”, Figure 2a, isoform 3), followed by the classic coding exons 2 and 3, in phase. This new messenger therefore encodes a protein that shares the last 92 amino acids but completely differs from the initially known form at the N-terminus and is not affected by the absence of the “classic” exon 1. This gene organization is conserved, while isoforms 1 and 3 are present in mice and humans. In 2019, Zhou et al. reported new isoforms of the human *SPATA3* gene [15]. They first identified a new isoform skipping exon 2, leading to a protein of 138 amino acids whose C-terminal end is different because of a frameshift, but whose abundance is unknown. They also described an alternative splicing within exon 1, where 27 bp would be spliced away. However, this is rather a documented polymorphism, referenced as rs 72362780, with different alleles of either 2 or 3 repeats of a 27 bp sequence encoding a QQPSPESTP motif, being almost equally frequent in the human population.

The initial knock-out was therefore considered as a partial KO, suppressing only some of the possible isoforms and probably leaving some not negligible residual SPATA3 activity. Another knock-out strategy was therefore adopted to delete all known coding exons. RNA guides located upstream exon 1bis and downstream exon 3 were used to generate a complete gene deletion of about 8 kb. Two independent KO lines were obtained for this complete invalidation that gave identical results. Sequencing of the locus confirmed the deletion of the coding exons and validated the precise breakpoints. The lack of expression of the *Spata3* cDNA was confirmed by RT-PCR, in the absence of an efficient antibody to detect the SPATA3 protein by Western blot. When mated with WT females, homozygous KO males could sire normally and produce normal litters. The absence of *Spata3* did not reproduce the in vivo hypofertility observed in Rc3 males [7]. However, in IVF assays, sperm lacking *Spata3* expression were less efficient to fertilize WT oocytes. Both the fertilization rate of cumulus-intact oocytes and the fertilization index of zona-free oocytes were drastically reduced. This difference of phenotype between in vivo and in vitro conditions has already been observed. It is probably due to the differences between an optimal in vivo fertilization and the artificial context of IVF where some parameters are not ideally reproduced. Thus, IVF could exacerbate a defect that is compensated for under physiological conditions. This observation has already been encountered for the sperm specific *Itgb1* KO [16] and for the mouse heterozygous for a *Spaca6* deletion [17]. This reduction of IVF efficiency was also detected in Rc3 males.

No gross abnormality could be detected in the testicular histology neither in sperm counts, suggesting a normal spermatogenesis. The sperm movement parameters explored by CASA were not affected. A reduction of the motile fraction had been observed in Rc3 males but here the decrease in IVF yield cannot be explained by a reduced motility of sperm. Sperm ultrastructure was explored by electronic microscopy to observe more subtle sperm alterations, as were reported in the Rc3 IRCS model [7]. Some abnormal sperm could be observed, mainly affecting the acrosome. As observed in the Rc3 line, an acrosome detached from the nucleus is more frequently reported in KO than in WT sperm. The acrosome sometimes looks out of shape, far from the expected symmetric cap aspect. It is very likely that the totally abnormal appearance of the sperm shown in Figure 5a is not really the ejaculated sperm phenotype but rather the result of manipulations which further damage the structure of these KO sperm compared to WT sperm. It is anyway a sign of a particular fragility of KO sperm. In addition, dark droplets in persistent cytoplasmic remnants were also visible. An Oil Red O coloration was performed and confirmed the lipid nature of these droplets contents and that they are much more present in KO sperm. These cytoplasmic bodies should have been removed by Sertoli cells in the last steps of spermiogenesis. It is not clear if the phagocytosis process is altered in KO testes, but SPATA3 has been shown to be expressed in germ cells, not in Sertoli cells. Alternatively, a dysfunction of lipid metabolism could be present in KO sperm, leading to an excess of lipid droplets that fail to be correctly phagocyted by Sertoli cells. Why this process of lipids accumulation happens will need more analyses. It is difficult to estimate exactly what percentage of sperm is abnormal, as, more than 10% showed lipid droplets, 15% appeared fully disorganized at the acrosome level, and some others showed milder defects.

In conclusion, male mice lacking the expression of the *Spata3* gene are fertile in vivo, thanks to the optimal context of sperm selection and gamete interaction. They are nevertheless hypofertile in vitro. Moreover, they have a higher frequency of abnormal sperm. Specifically, they have more abnormal acrosomes that tend to untie from the nucleus and more cytoplasmic bodies showing an imperfect spermiogenesis and spermiation.

The *Spata3* KO, though modestly affecting sperm capacities, is therefore an incomplete reproduction of the Rc3 IRCS mouse line, that was considered as a model of partial globozoospermia. Two hypotheses can be proposed. It is possible that the complete suppression of SPATA3 protein expression in the invalidated mouse on one side and the expression of a modified SPATA3 protein in the IRCS on the other have different impacts on sperm function. The presence of a deleterious protein could be more damaging than

its absence, if for example, some compensatory mechanisms can set up. Some of the polymorphisms existing between *spretus* and C57Bl/6 strains are indeed individually predicted to affect protein function. However, no prediction model can aggregate the effect of the 14 non-synonymous changes on the integrity of the different protein isoforms, especially on a protein of unknown function. The alternative hypothesis is that another gene within the *Mafq1* interval contributes to the complex phenotype of the Rc3 males. One or more gene(s) present in the QTL interval and exhibiting variations in the *spretus* strain compared to the C57Bl/6 strain, likely missense changes affecting protein function but also possibly regulatory variants affecting protein levels, could also be dysfunctional in the Rc3 line. The cumulative effects of two or more disturbed genes could be necessary to affect more drastically sperm function, either directly if proteins are acting together or indirectly if they have different functions whose anomalies add at different stages or pathways to generate the defects profile at the end. A careful re-analysis of the identity and characteristics of the genes present in the Rc3 interval could suggest other candidates that could participate in the phenotype.

On the human side, SPATA3 and other potential candidate genes from the QTL region should be screened in infertile/hypofertile patients with signs reminiscent of globozoospermia. Furthermore, genes identified in this QTL region will be particularly closely analyzed in our future whole exome sequencing studies of infertile patients.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

All animal experiments were performed in agreement with national guidelines for the care and use of laboratory animals. Experimentation was approved by the local ethics committee (C2EA-34, Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale Paris Descartes) and the governmental ethical review committees via the APAFiS Application (Autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques), under the registration reference APAFIS #14124-2017072510448522 v26, A. Ziyat (10/102018-10/10/2023).

Mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). All animals were maintained at the animal facility of the Cochin Institute (Paris) at a stable temperature (21–23 °C) and 14 h light/10 h dark photoperiods, with free access to food and water.

4.2. Generation of Transgenic Mice

The Crispr/Cas9 approaches were performed at the Transgenesis and Homologous Recombination platform (PRHTEC) of the Cochin Institute, Paris, France. RNA guides were selected, produced by TACGENE (Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, France) and tested in vitro (targeting upstream exon 1 bis: ACCGGACAGACATGGAACAG; GCTGGGAC-CCCTGTTAGCCAA; GTTGTGACATGCTCCAGGGAA- targeting downstream exon 3: GGACCCAGGCCACCGTC; GTAGAGAAGACTATCTCAAGG; GGCCACCGTCCG-GCAGGT).

They were preincubated with Cas9 and then microinjected into fertilized C57Bl/6J oocytes.

Embryos that had passed to the 2-cell stage were transferred into the oviducts of pseudopregnant females.

4.3. PCR and RT-PCR

Genotyping was performed on DNA extracted from tail biopsies (NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel, Düren, Germany) using the GoTaq Flexi polymerase (Promega, Madison, WI, USA) under standard PCR conditions. Primers are listed in Table S2. The integrity of the areas targeted by the guides was tested to detect WT alleles. A large amplification encompassing the whole locus was also performed to detect deleted alleles.

RNA was obtained by TRIzol (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) extraction from WT and KO testes. Five micrograms of total RNA were treated with DNase I (Promega) and retrotranscribed using the MMLV reverse transcriptase (Thermo Fis-

cher Scientific) following manufacturer's instructions. RT-PCR was performed using the GoTaq Flexi polymerase to test the expression of *Spta3* and a reference gene as normalization control.

4.4. In Vivo and In Vitro Fertility Assessment

Mice, aged from 8 to 12 weeks, were housed as one male and one female per cage. WT females were mated overnight with WT males or homozygous KO males and checked for vaginal plugs the next day. For each group, litter sizes were assessed.

Wild-type 5–8 weeks-old female mice were superovulated with a 10 IU pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) injection, then 48 h later with a 10 IU human chorionic gonadotrophin (hCG) injection (Intervet, Beaucozé, France). The next day, 14 h post-injection, animals were sacrificed by cervical dislocation. Cumuli oophori were retrieved by tearing the ampulla wall of the oviduct, placed in Ferticult medium (FertiPro, Beernem, Belgium) supplemented with 3% bovine serum albumin (BSA), and maintained at 37 °C under 5% CO₂ in air, under mineral oil (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

For zona-free IVF assay, oocytes were released from the cumulus cells by 3–5 min incubation at 37 °C with hyaluronidase (Sigma Aldrich) in M2 medium (Sigma Aldrich), rinsed and kept in Ferticult medium, BSA 3% at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere with mineral oil (Sigma Aldrich). The zona pellucida was then dissolved with acidic Tyrode's (AT) solution (pH 2.5, Sigma Aldrich) under visual monitoring. Zona-free eggs were rapidly rinsed in a Ferticult medium, BSA 3% and kept at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere for 2 to 3 h to recover.

Mouse spermatozoa were obtained from the cauda epididymis of control or KO male mice aged 8 to 13-weeks. They were capacitated at 37 °C under a 5% CO₂ for 90 min in a 500 µL drop of Ferticult medium supplemented with 3% BSA (30 mg/mL), under mineral oil.

Cumulus-intact or zona-free oocytes were inseminated in a 100 µL drop of Ferticult medium, BSA 3% with capacitated spermatozoa at a final concentration of 1×10⁶/mL or 1×10⁵/mL, respectively, for 3 h. They were then washed and directly mounted in Vectashield/DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for observation under UV light (Zeiss Axioskop 20 microscope, Marly le Roi, France). Oocytes were considered fertilized when a fluorescent decondensed sperm head could be visualized within their cytoplasm.

4.5. Histology, Staining and Immunostaining of Sperm and Testes

Testes from adult WT and KO males were collected. They were fixed overnight in 4% (*w/v*) paraformaldehyde in PBS, dehydrated and embedded in paraffin. Serial 5 µm thick sections were cut on a microtome and stored at room temperature. Testis sections were rehydrated before Hematoxylin-eosin (H&E) staining.

For Immunofluorescence staining, slides were permeabilized during 10 min in PBS 1× and with triton 0.2% at RT, and were then saturated for 30 min in PBS, BSA 3% and Goat serum 10%. Slides were incubated for 1 h in a polyclonal anti-TSARG1 antibody at 1:20 in PBS (T-18, sc-67901, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX; reference no longer available), washed three times in PBS, BSA 1%. DAPI (5 µg/mL, Sigma Aldrich) and secondary antibody (anti-Goat-Alexa 488 at 10 µg/mL, ThermoFischer Scientific) were used at RT during 1 h, followed by three washes and slides were mounted with the Dako Fluorescent mounting medium (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

For Papanicolaou staining, sperm were retrieved from cauda epididymes in Ferticult medium and spread onto a Superfrost Plus slide (ThermoFischer Scientific). Sperm cells were fixed by incubation with PBS, paraformaldehyde 4% for 10 min and stained following the Papanicolaou protocol (Hematoxylin, OG6, EA50). Briefly, the slides were washed in 95% ethanol and inserted in Harris hematoxylin for 3 min for nucleus counterstaining, and washed, stained with OG-6 dye (RAL diagnostics 05.12013, Martillac, France) and with EA-50 (RAL diagnostics 05.12019, Martillac, France). Then the slides were dehydrated (95% ethanol absolute ethanol and xylene) and mounted with a permanent mounting medium.

Freshly recovered or capacitated sperm were washed in PBS containing 1% BSA, centrifuged at 300 g for 5 min and immediately fixed in 4% Paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, PA, USA) in PBS-1% BSA for 10 min at room temperature. In order to detect the sperm acrosomal status, after washing, fixed spermatozoa were stained with FITC-conjugated lectin *Pisum Sativum* Agglutinin (PSA; 25 µg/mL in PBS, Sigma Aldrich) for 15 min. After repeated washing with PBS-BSA 1%, a drop of sperm suspension was smeared on a slide, air-dried, mounted with Vectashield-DAPI. Detection was performed using a Nikon Eclipse E600 microscope Zeiss Axiophot epifluorescence microscope and images were digitally acquired with a camera (Coolpix 4500, Nikon, Champigny sur Marne, France).

For Oil Red O (ORO) staining, a drop of freshly recovered or capacitated sperm was smeared on a slide, air-dried and immediately fixed in PFA 4% and stored at -80°C until the day of use. Slides were post-fixed for 10 min in PFA 4%, then rinsed and quenched with NH_4Cl 50 mM for 10 min. After rinsing, cells were permeabilized for 4 min with triton X-100 0.5%. Finally, cells were stained by an incubation of one hour with Oil-Red-O (Sigma Aldrich) and counter-stained with hematoxylin of Mayer. Lipids appeared as red droplets and nuclei appeared to be blue. The amount of lipid droplets by ORO staining in sperm cells was quantified using a light microscope.

4.6. Mouse Sperm Motility Analysis

Sperm motility was assessed by Computer Aided Sperm Analysis (CASA) using CEROS II apparatus (Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA). Briefly, mouse spermatozoa were obtained from the cauda epididymis of *Sptat3* KO or WT C57BL6/J mice (8 to 10 weeks old) and capacitated at 37°C under 5% CO_2 for 90 min in a 500 µL drop of Fertiluc medium supplemented with 3% BSA, under mineral oil. The movements of at least 500 sperm cells per sample were analyzed in 20 µm chambers (Leja Products B.V., Nieuw-Vennep, Netherlands) with Zeiss AX10 Lab. A1 microscope (10× objective), using HT CASAI software.

The settings were as follows: acquisition rate, 60 Hz; number of frames, 45; minimum head brightness, 175; minimum tail brightness, 80; minimum head size, $10\ \mu\text{m}^2$; minimum elongation gate, 1%; maximum elongation gate, 100%; objective magnification factor, 1.2.

The principal motility parameters measured were: curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), beat/cross frequency (BCF), amplitude of lateral head displacement (ALH).

4.7. Electronic Microscopy

Mouse spermatozoa from males were prepared as described above (IVF) and fixed by incubation in PBS supplemented with 2% glutaraldehyde (Grade I, Sigma) for 2 h at room temperature. Samples were washed twice in PBS and post-fixed by incubation with 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences), after which they were dehydrated by immersion in a graded series of alcohol solutions and embedded in Epon resin (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA). Ultra-thin sections (90 nm) were cut with a Reichert Ultracut S ultramicrotome (Reichert-Jung AG, Wien, Austria) and were then stained with uranyl acetate and lead citrate. Sections were analyzed with a JEOL 1011 microscope and digital images were acquired with a Gatan Erlangshen CCD camera and Digital Micrograph software. The integrity of sperm organelles was checked including the acrosome, nucleus, flagellum, etc. Acrosomes with a space between the nuclear membrane and the inner acrosomal membrane were considered abnormal. Acrosomes with membranes in close contact were considered normal. The presence of residual bodies and lipid droplets was recorded.

4.8. Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM of at least three independent experiments. For statistical analysis, *t*-Test was performed using GraphPad Prism version 7.00 for

Windows, (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. When data were not normally distributed, a Welch's correction was applied.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/1959/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, R.P., S.B. and A.Z.; methodology, M.-S.G., C.V., S.D., R.P., M.F., L.S. and C.I.-R.; validation, M.-S.G., C.V., S.D. and C.I.-R.; formal analysis, A.Z. and S.B.; investigation, M.-S.G., C.V., S.D., L.S. and C.I.-R.; writing—original draft preparation, S.B. and A.Z.; writing—review and editing, A.Z. and S.B.; visualization, A.Z., and S.B.; supervision, S.B. and A.Z.; funding acquisition, A.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université de Paris.

Institutional Review Board Statement: All animal experiments were performed in agreement with national guidelines for the care and use of laboratory animals. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee. (C2EA-34, Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale Paris Descartes) and the governmental ethical review committees via the APAFiS Application (Autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques), under the registration reference APAFiS #14124-2017072510448522 v26, A. Ziyat (10/10/2018-10/10/2023).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank the staff of the animal facility and the PRHTEC platform of the Cochin Institute, and A. Schmitt from the Electronic Microscopy Facility (Cochin Institute, Paris). The authors thank A. Touré and F. Saez for providing advice.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

WT	Wild-type
KO	Knock-out
IRCS	Interspecific Recombinant Congenic Strain
FR	Fertilization Rate
FI	Fertilization Index
IVF	In Vitro Fertilization
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
QTL	Quantitative Trait Locus
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole

References

- Schultz, N.; Hamra, F.K.; Garbers, D.L. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12201–12206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Celse, T.; Cazin, C.; Mietton, F.; Martinez, G.; Martinez, D.; Thierry-Mieg, N.; Septier, A.; Guillemain, C.; Beurois, J.; Clergeau, A.; et al. Genetic analyses of a large cohort of infertile patients with globozoospermia, DPY19L2 still the main actor, GGN confirmed as a guest player. *Hum. Genet.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Coutton, C.; Abada, F.; Karaouzene, T.; Sanlaville, D.; Satre, V.; Lunardi, J.; Jouk, P.S.; Arnoult, C.; Thierry-Mieg, N.; Ray, P.F. Fine characterisation of a recombination hotspot at the DPY19L2 locus and resolution of the paradoxical excess of duplications over deletions in the general population. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dam, A.H.; Koscinski, I.; Kremer, J.A.; Moutou, C.; Jaeger, A.S.; Oudakker, A.R.; Tournaye, H.; Charlet, N.; Lagier-Tourenne, C.; van Bokhoven, H.; et al. Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* **2007**, *81*, 813–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Liu, G.; Shi, Q.W.; Lu, G.X. A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia. *Asian J. Androl.* **2010**, *12*, 556–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Yatsenko, A.N.; O'Neil, D.S.; Roy, A.; Arias-Mendoza, P.A.; Chen, R.; Murthy, L.J.; Lamb, D.J.; Matzuk, M.M. Association of mutations in the zona pellucida binding protein 1 (ZPBP1) gene with abnormal sperm head morphology in infertile men. *Mol. Hum. Reprod.* **2012**, *18*, 14–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Vatin, M.; Girault, M.S.; Firlej, V.; Marchiol, C.; Ialy-Radio, C.; Montagutelli, X.; Vaiman, D.; Barboux, S.; Ziyyat, A. Identification of a New QTL Region on Mouse Chromosome 1 Responsible for Male Hypofertility: Phenotype Characterization and Candidate Genes. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8506. [[CrossRef](#)]
8. Fu, J.J.; Lu, G.X.; Li, L.Y.; Liu, G.; Xing, X.W.; Liu, S.F. Molecular cloning for testis spermatogenesis cell apoptosis related gene TSARG1 and Mtsarg1 and expression analysis for Mtsarg1 gene. *Yi Chuan Xue Bao* **2003**, *30*, 25–29.
9. Li, L.; Liu, G.; Fu, J.J.; Li, L.Y.; Tan, X.J.; Yang, S.; Lu, G.X. Molecular cloning and characterization of a novel transcript variant of Mtsarg1 gene. *Mol. Biol. Rep.* **2009**, *36*, 1023–1032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Malcher, A.; Rozwadowska, N.; Stokowy, T.; Kolanowski, T.; Jedrzejczak, P.; Zietkowiak, W.; Kurpisz, M. Potential biomarkers of nonobstructive azoospermia identified in microarray gene expression analysis. *Fertil. Steril.* **2013**, *100*, 1686–1694.e7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Oh, J.J.; Shivakumar, M.; Miller, J.; Verma, S.; Lee, H.; Hong, S.K.; Lee, S.E.; Lee, Y.; Lee, S.J.; Sung, J.; et al. An exome-wide rare variant analysis of Korean men identifies three novel genes predisposing to prostate cancer. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Darde, T.A.; Lecluze, E.; Lardenois, A.; Stevant, I.; Alary, N.; Tuttelmann, F.; Collin, O.; Nef, S.; Jegou, B.; Rolland, A.D.; et al. The ReproGenomics Viewer: A multi-omics and cross-species resource compatible with single-cell studies for the reproductive science community. *Bioinformatics* **2019**, *35*, 3133–3139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Darde, T.A.; Sallou, O.; Becker, E.; Evrard, B.; Monjeaud, C.; Le Bras, Y.; Jegou, B.; Collin, O.; Rolland, A.D.; Chalmel, F. The ReproGenomics Viewer: An integrative cross-species toolbox for the reproductive science community. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W109–W116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Okada, Y.; Scott, G.; Ray, M.K.; Mishina, Y.; Zhang, Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature* **2007**, *450*, 119–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zhou, B.; Wei, C.; Khan, M.A.; Chen, H.; Fu, J. Characterization and molecular cloning of novel isoforms of human spermatogenesis associated gene SPATA3. *Mol. Biol. Rep.* **2019**, *46*, 3827–3834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Barraud-Lange, V.; Ialy-Radio, C.; Chalas, C.; Holtzmann, I.; Wolf, J.P.; Barboux, S.; Ziyyat, A. Partial Sperm beta1 Integrin Subunit Deletion Proves its Involvement in Mouse Gamete Adhesion/Fusion. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Barboux, S.; Ialy-Radio, C.; Chalbi, M.; Dybal, E.; Homps-Legrand, M.; Do Cruzeiro, M.; Vaiman, D.; Wolf, J.P.; Ziyyat, A. Sperm SPACA6 protein is required for mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

VI. Article N°3

The lack of *Tex44* causes severe subfertility in male mice via a MAAF phenotype

Prêt à être soumis

Sophie Dupuis, Marie-Sophie Girault, Côme Ialy-Radio, Morgane Le Beulze, Ahmed Ziyat et Sandrine Barbaux

The lack of *Tex44* causes severe subfertility in male mice via a MAAF phenotype

Sophie Dupuis¹, Marie-Sophie Girault¹, Morgane Le Beulze¹, Côme Ialy-Radio¹, Ahmed Ziyat^{1,2,†} and Sandrine Barbaux^{1,*†}

¹ Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014 PARIS, France.

² Service d'Histologie, d'Embryologie, Biologie de la Reproduction, AP-HP, Hôpital Cochin, F-75014 PARIS, France

* Correspondence: sandrine.barbaux@inserm.fr.

† Contributed equally to this work

Abstract

By analyzing a mouse Interspecific Recombinant Congenic Strain (IRCS), we previously identified a quantitative trait locus (QTL), named *Mafq1* on chromosome 1, which is associated with male hypofertility and ultrastructural sperm abnormalities. Within this locus, we identified a new candidate gene that could be implicated in a reproductive phenotype: *Tex44* (Testis-expressed protein 44). We thus performed a CRISPR-Cas9 mediated complete deletion of this gene in mice in order to study its function. *Tex44*-KO males were severely hypofertile *in vivo* and *in vitro* due to a drastic reduction of sperm motility which itself resulted from important morphological sperm abnormalities. In fact, *Tex44*-KO sperm showed a disorganized junction between the midpiece and the principal piece of the flagellum, leading to a 180° flagellar bending in this region. In addition, the loss of some axonemal microtubule doublets and outer dense fibers in the flagellum's principal piece have been observed. Our results suggest that, in mice, *TEX44* is implicated in the correct set-up of the sperm flagellum during spermatogenesis. Its absence leads to a multiple morphological anomalies of the flagellum (MAAF) syndrome and consequently to male infertility.

Keywords: spermatogenesis; male infertility; flagellar bending; sperm; mouse model; MMAF

Introduction

Human infertility is a major public health issue that concerns 10-20% of couples of reproductive age. In half of the cases the cause is due to male infertility¹. Among the different causes of male infertility, quantitative and/or qualitative sperm abnormalities can be involved such as low sperm count (oligozoospermia), reduced sperm motility (azthenozoospermia) and abnormal sperm morphology (teratozoospermia).

Among the different causes of male infertility, the proper functioning of spermatogenesis, that is a very complex process by which sperm cell production occurs in the testis, can be impacted by genetic defects. With at least 120 implicated genes described in the literature², genetic factors appear to have a strong share of involvement in human male infertility cases. However, most of these latter remain with an unknown genetic cause³.

Mouse models are very useful to explore the function of candidate gene predicated to be involved in infertility since this functional investigation is difficult in humans. Thanks to the analysis of a specific hypofertile Interspecific Recombinant Congenic Strain (IRCS) mouse line previously described, we were able to define the *Mafq1* (male fertility chromosome 1) quantitative trait locus as an interval on the mouse Chromosome 1 associated with male hypofertility and sperm morphological abnormalities⁴. In this *Mafq1* locus, we previously identified *Spata3* as a candidate gene and we demonstrated that the deletion of this gene partially reproduced the phenotype of the hypofertile IRCS strain⁵. However, we recently found that a new testis-specific gene, the *Testis expressed protein 44* (*Tex44*), was reported in one of the latest versions of the mouse and human genomes and is present within the *Mafq1* locus.

Tex44 is conserved among many mammalian species, with human and mouse proteins sharing 46% of their identity. It is specifically expressed in the testis in both mice and humans, with an expression in late spermatids⁶. No data is available concerning the function of the TEX44 protein that does not present any obvious known functional domain (Human Atlas Protein). Indeed, the *TEX44* gene belongs to the TEX family only because of its expression pattern in the testis and not because of a specific function. To date, 69 *TEX* or *Tex* genes have been described in the human or mouse genomes⁷. In the mouse model, three genes have been related to subfertility (*Tex17, 18, 40*) and eight genes have been associated to infertility (*Tex11, 12, 14, 15, 19, 19.1, 38, 101*). Among them, three genes (*TEX11, TEX14* and *TEX15*) have been linked to azoospermia and/or infertility in humans^{2,7}.

We produced a mouse line invalidated for the *Tex44* gene in order to understand the function of this gene. We observed that male mice lacking *Tex44* expression are drastically hypofertile *in vivo* and *in vitro* and that *Tex44*-KO sperm exhibit several ultrastructural anomalies.

Results

Tex44-KO male mice present drastic hypofertility *in vivo* and *in vitro*.

Mice invalidated for *Tex44* were generated using a CRISPR-Cas9 strategy at the Institut Clinique de la Souris (Celphedia, Phenomin, ICS, Illkirch). Guides located within both 5' and 3' UTR regions allowed the targeting and deletion of the complete unique exon of *Tex44*. Animals presenting a deletion of *Tex44* were validated by PCR amplification and sequencing of the locus as illustrated in Figure 1. Different crossings were performed to produce homozygous knock-out animals (*Tex44*-KO).

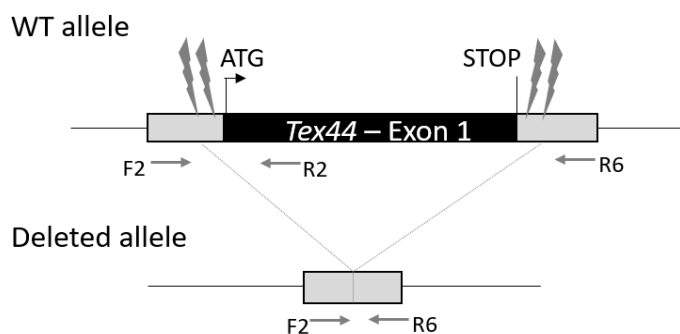


Figure 1. CRISPR-Cas9 strategy for *Tex44* mono-exonic gene deletion. RNA guides are represented upstream and downstream of the *Tex44* open reading frame as thunderbolts. The primers used are represented by the F2, R2 and R6 arrows.

In order to test *in vivo* fertility, Wild-Type (WT) and *Tex44*-KO littermates males were mated with C57BL/6J WT females. The average litter size was significantly different when pups were born from *Tex44*-KO males (2.9 ± 0.85 ; $n = 15$) compared to those born from WT males (7.1 ± 0.85 ; $n = 14$) (Figure 2a). When females showed a vaginal plug after mating but not followed by gestation, the number of pups per litter was recorded as null.

In vivo fertilization assays have been achieved with superovulated C57BL/6J WT females that were mated overnight with WT or *Tex44*-KO males. The next day, females showing a vaginal plug were sacrificed and cumulus-intact oocytes were retrieved to evaluate the *in vivo* fertilization rate (FR: the average number of fertilized oocytes among the total number of oocytes). The FR was significantly different: 96.1 ± 0.04 % ($n=129$) for the control condition (WT) and 19.6 ± 0.04 % ($n=92$) for the KO condition ($p < 0.0001$) (Figure 2b).

For *in vitro* fertilization assays, cumulus-intact and zona-free oocytes from WT females were incubated with sperm from WT or KO males. For the cumulus-intact IVF assays, the FR was 44.4 ± 0.04 % ($n=151$) for the control condition (WT) and 0.8 ± 0.04 % ($n=124$) for the KO condition ($p < 0.0001$) (Figure 2c). For the zona-free assays, the fertilization index (FI: the average number of fused sperm per oocyte) was 1.2

± 0.11 (n = 50) for the control condition and 0.14 ± 0.11 (n = 55) for the KO condition ($p < 0.0001$) (Figure 2d).

These observations suggested that the deletion of *Tex44* drastically affects the successful process of fertilization both *in vivo* and *in vitro*.

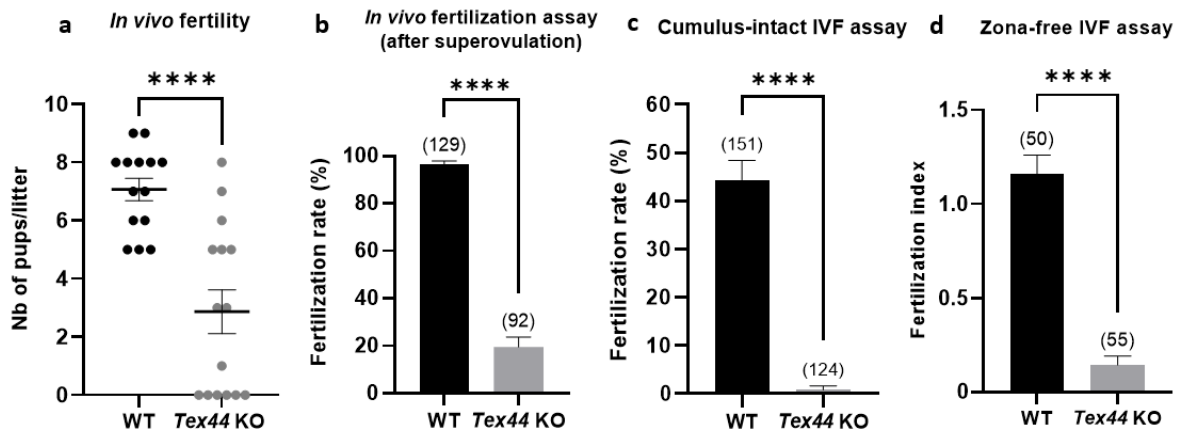


Figure 2. Evaluation of *Tex44*-KO male fertility *in vivo* (a,b) and *in vitro* (c,d). (a). WT females were mated with WT or KO males and litter size (mean \pm SEM) was counted after 3 weeks of gestation whose beginning was attested by the presence of a vaginal plug after the overnight mating. (b). Superovulated WT females were mated with WT or KO males to evaluate their capacity to fertilize *in vivo*. The day following the overnight mating, only females showing a vaginal plug attesting that a mating has occurred were used for the experiments. The fertilization rate (FR) (mean \pm SEM) was assessed by the *in vivo* fertilization assay. (c). The fertilization rate (FR) (mean \pm SEM) was assessed by cumulus-intact In Vitro Fertilization (IVF) assay at 10^6 (WT and KO) sperm per ml. No fertilization was obtained with *Tex44*-KO sperm. (d). The fertilization index (FI) (mean \pm SEM) was assessed by zona-free IVF assay at 10^5 (WT or KO) sperm per ml. FI was significantly decreased when oocytes were inseminated with KO sperm compared to WT. All experiments were repeated at least three times. **** $p < 0.0001$. Numbers between brackets indicate the number of oocytes.

Tex44-KO male mice present sperm morphological abnormalities

In order to better understand why *Tex44*-KO males are highly hypofertile *in vivo* and *in vitro*, we characterized them in a more thorough manner. Histology of the *Tex44*-KO males testes showed no obvious abnormalities (Figure 3a) and the sperm counts from the epididymal cauda were not statistically different between WT and *Tex44*-KO males ($52.5 \pm 4.9 \times 10^6$ sperm/ml for the WT males (n=8) vs. $47.6 \pm 4.9 \times 10^6$ sperm/ml (n=9) for the *Tex44*-KO males) (Figure 3b).

But the analysis of the sperm motility using the Computer Aided Sperm Analysis (CASA) system revealed a drastic difference between WT sperm that showed 63.2 ± 0.03 % of motility and *Tex44*-KO sperm that showed 8.7 ± 0.03 % of motility (Figure 3c).

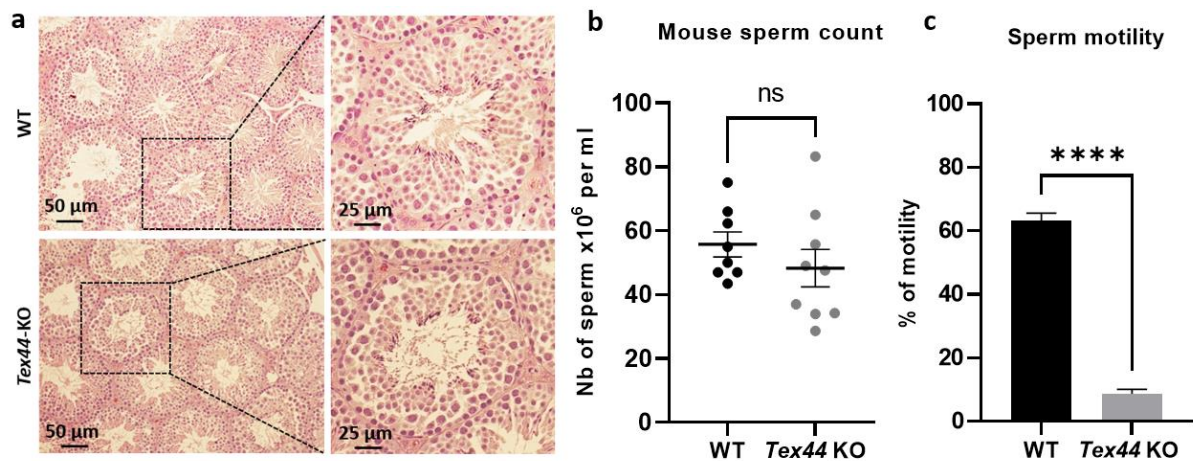


Figure 3. Histology of testes, sperm counts and motility analysis of WT and *Tex44*-KO males. (a). No obvious abnormalities of testes histology were observed between WT and *Tex44*-KO. (b). No significant difference was observed between WT and *Tex44*-KO cauda epididymal sperm count. (c). Analysis of sperm motility by Computer Assisted Semen Analysis (CASA). CASA analyses showed a drastic reduction of motility of the *Tex44*-KO sperm compared to the WT sperm. Data are represented as the mean ± SEM of at least three sperm samples of each group of males (WT and KO). **** $p < 0.0001$.

Observation of sperm morphology under light microscopy showed obvious defects on the *Tex44*-KO sperm retrieved from the cauda of the epididymis (Figure 4a,b,d-f). These KO sperm showed disjunction and severe hairpin bending between the midpiece and the principal piece (MP-PP).

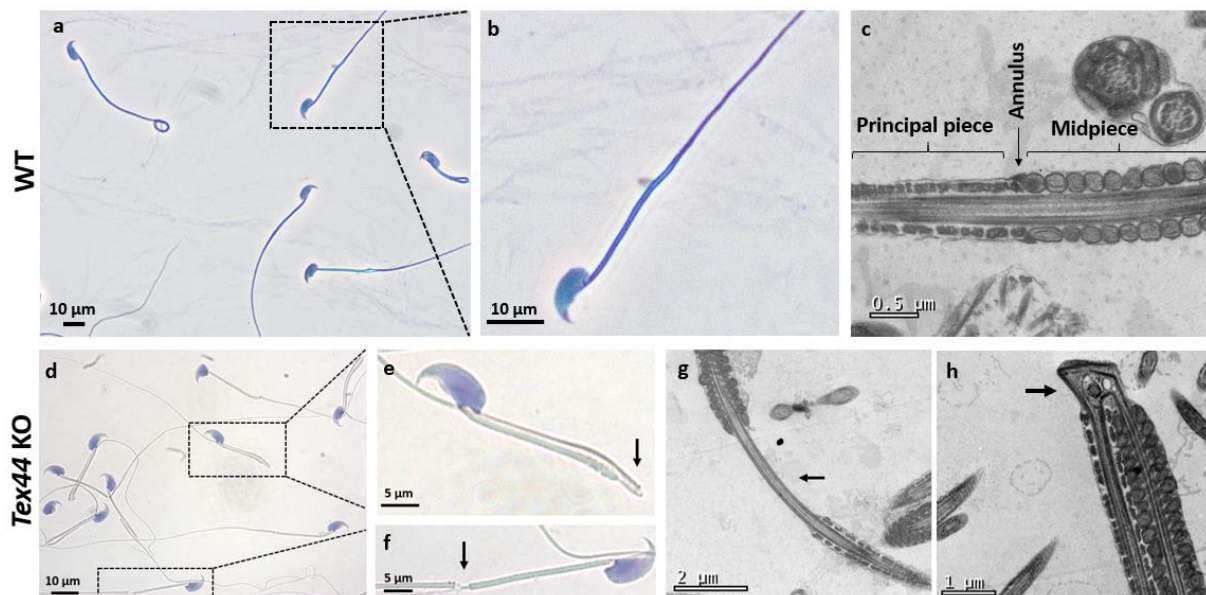


Figure 4. Characterization of the sperm morphology by light (a,b,d-f) and electron microscopy (c,g,h). Papanicolaou staining of WT and *Tex44*-KO sperm, retrieved from the cauda epididymis (a,d), with the associated enlargement of the framed areas respectively (b) for the WT and (e) and (f) for the *Tex44*-KO sperm. Example of a severe bending of the flagellum between the midpiece (MP) and the principal piece (PP), observed in *Tex44*-KO sperm in light microscopy (e) and electron microscopy (h). Example of a MP-PP disjunction of the flagellum observed in *Tex44*-KO sperm in light microscopy (f) and electron microscopy (g). The arrows (g,h) show the two kinds of abnormalities observed on the sperm flagellum.

In order to stage these abnormalities observed on the flagellum, we isolated sperm from the testis and from the three main regions of the epididymis (caput/corpus/cauda). The proportion of severe hairpin

bending in the *Tex44*-KO sperm increased along the progression through the three regions of the epididymis. The latter passed from 12% in the caput, to 58% in the corpus and finally 80% in the cauda (Figure 5). No severe bending was observed in the testis sperm but 65% of these testicular *Tex44*-KO sperm showed a thinning between the midpiece and the principal piece. Images caput/corpus/cauda as supplemental data.

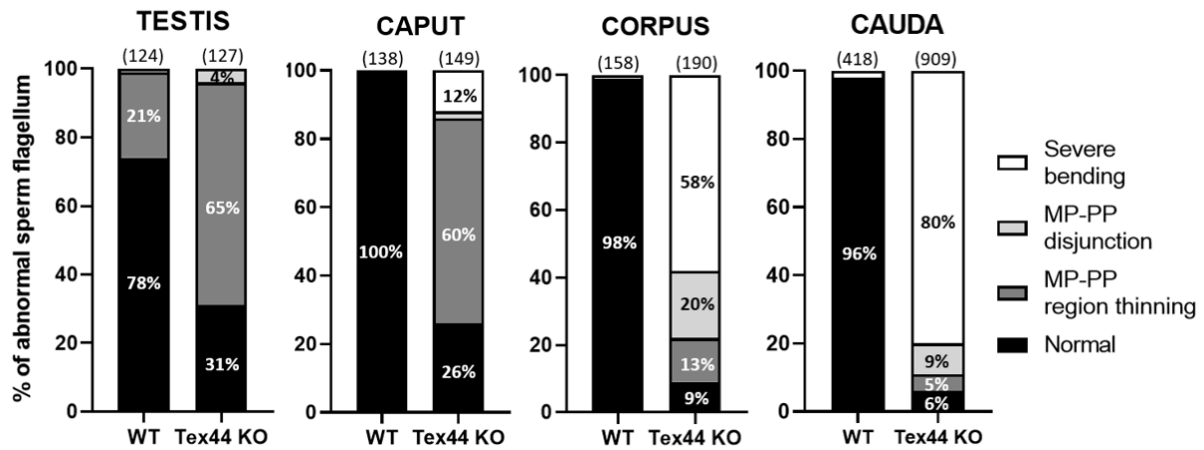


Figure 5. Comparison of the sperm flagellum abnormalities of WT and *Tex44*-KO sperm from testis and from caput, corpus and cauda epididymis. By going through the different stages of maturation in the epididymis, the *Tex44*-KO sperm morphological phenotype gets worse, evolving from a majority of midpiece-principal piece (MP-PP) disjunction to a majority of severe bending of the flagellum. Numbers between brackets indicate the number of individual sperm observed.

Tex44-KO male mice present other sperm ultrastructural abnormalities

Sperm samples were then analyzed by electronic microscopy to confirm the ultrastructural defects observed previously and to reveal those that could not be visible through light microscopy. In addition to the sperm flagellar MP-PP disjunction and hairpin bending showed in Figure 4f-g, transversal sections of the principal piece (PP) often showed lack of some microtubule doublets and their associated outer dense fibers (63,6 ± 0.06% of PP abnormalities for the *Tex44*-KO sperm vs. 4,2 ± 0.06% for the WT sperm). (Figure 6 a-b).

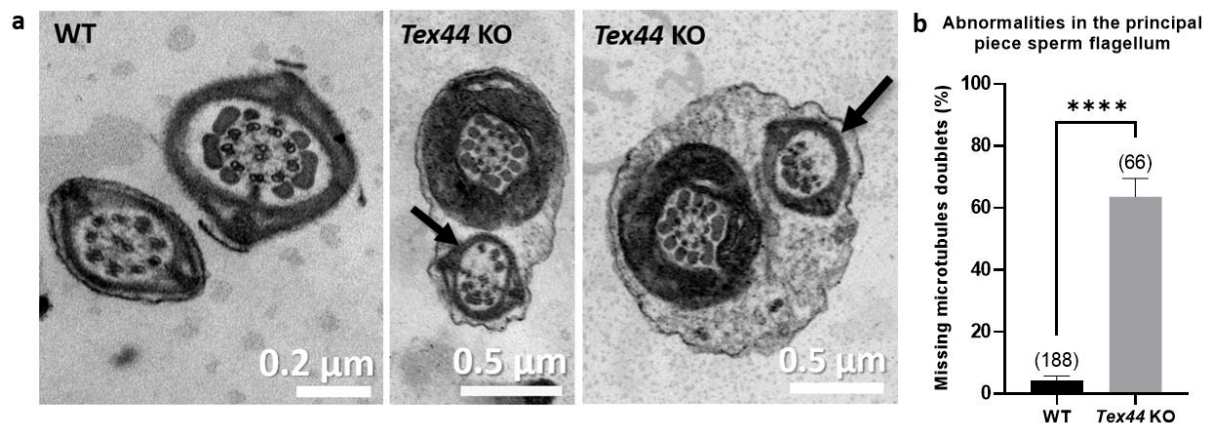


Figure 6. Electronic microscopy analysis of cross-sections of WT and *Tex44*-KO sperm's flagellum. (a). Examples of the lack of some microtubule doublets and their associated outer dense fibers in the principal piece of the *Tex44*-KO sperm's flagellum. (b). Counting of the sperm displaying the phenotype showed in panel (a), in WT and *Tex44*-KO cross-sections of the sperm's flagellum. Numbers between brackets indicate the number of sperm flagellum's cross-sections analyzed. **** $p < 0.0001$.

Presence of the annulus in *Tex44*-KO male mice sperm

Given that *Tex44*-KO sperm exhibit flagellar disjunction and a hairpin bending at the junction between the MP and PP, the question of the integrity of the annulus, a fibrous ring-like structure organized by a Septin and located between the MP and the PP of the flagellum, has arisen. We thus realized an immunofluorescence on cauda epididymal sperm with an anti-SEPT4 antibody to detect the latter protein which is a conserved annulus protein⁸. A specific ring staining was observed between the midpiece and the principal piece of the flagellum in the WT and *Tex44*-KO sperm despite their abnormal structure in this latter (Figure 7). This result suggests that the annulus structure does not seem to be impacted by the absence of *TEX44* in the sperm.

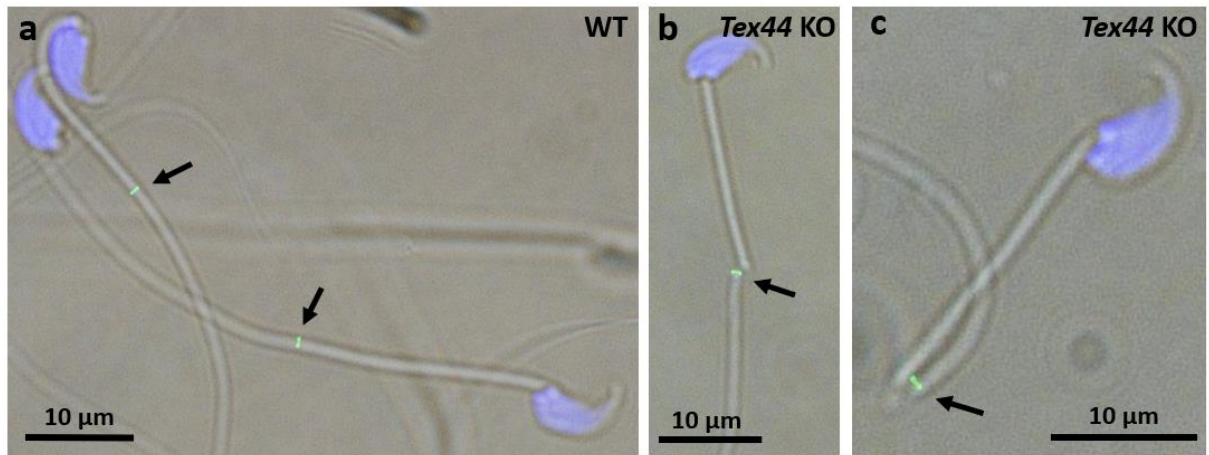


Figure 7. Presence of the annulus on the *Tex44*-KO flagellum. Immunostaining of WT (a) and of *Tex44*-KO (b,c) cauda epididymal sperm with an anti-SEPT4 antibody showing for both a specific ring staining between the midpiece and the principal piece of the flagellum, despite the abnormal flagellum structure in the KO.

Lower mitochondrial activity of the *Tex44*-KO sperm

Because of the major defect in motility and in order to characterize the sperm mitochondrial activity, we used the Mitotracker™ CMTMRos which is a probe that passively diffuses across the plasma membrane and accumulates in active mitochondria. (Figure 8a). As presented in the violin plot, we can notice that the *Tex44*-KO sperm tend to be predominantly of low fluorescence intensity compared to the WT sperm that are more uniformly distributed between low and high relative fluorescence intensity. These results suggest that *Tex44*-KO sperm show a significant lower mitochondrial activity than the WT sperm. In some cases, abnormal mitochondria structures can be observed in electron microscopy (Figure 8b). Even if this phenotype was not observed in WT, it remained rare in KOs preventing any statistical comparison.

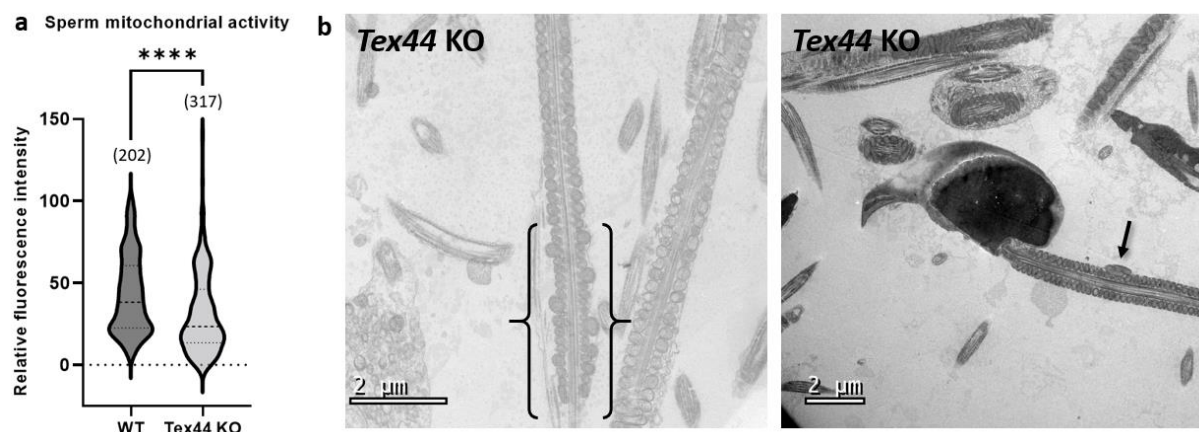


Figure 8. Characterization of the sperm mitochondrial activity by Mitotracker™ CMTMRos staining (a) and examples of mitochondrial abnormalities observed in the KO. (a). *Tex44*-KO sperm show a lower mitochondrial activity. Numbers between brackets indicates the number of sperm analyzed. **** $p < 0.0001$. (b). Electronic microscopy analysis of longitudinal sections of *Tex44*-KO flagellum sperm. Example of abnormal size of mitochondria is shown between brackets and supernumerary mitochondria shown by an arrow.

Discussion

Among the list of candidate genes within the *Mafq1* QTL interval, responsible of a hypofertility phenotype observed in the Rc3 IRCS strain⁴, the *Spata3* gene had appeared to be a good candidate gene. Its deletion partially reproduced the phenotype of the hypofertile IRCS strain. In fact, it induced morphological alterations in sperm, including abnormal anchoring of the acrosome to the nucleus and the persistence of residual bodies in the sperm midpiece, and an hypofertility only observed *in vitro*⁵. However, in one of the latest versions of the mouse and human genomes, a new gene, *Tex44*, has been described in our interval of interest on mouse chromosome 1 and its syntenic region on human chromosome 2. Its function is unknown, but *Tex44* corresponds to the only other candidate gene expressed specifically in the testis, at the spermatid stage, and showing genetic polymorphisms in the hypofertile IRCS mouse line, predicted to affect protein function. We therefore generated *Tex44*-KO mice in order to study the role of the TEX44 protein in male fertility and particularly in spermatogenesis. *In vivo* crossings with KO males showed a reduced average litter size. Though some WT females were positive for a vaginal plug after mating with KO males, no birth could be detected after 3 weeks. In order to understand if this *in vivo* hypofertility was either due to an embryonic development defect or to a fertilization defect, we achieved *in vivo* fertilization assays with WT superovulated females that were mated overnight with WT or *Tex44*-KO males. The next day, oocytes of females showing a vaginal plug were retrieved and the *in vivo* fertilization rate appeared to be drastically reduced in the KO group, confirming a fertilization defect of the *Tex44*-KO sperm. In a similar way, *Tex44*-KO sperm almost completely failed to fertilize WT oocytes both in cumulus-intact IVF and in zona-free IVF assays. The deletion of *Tex44* thus reproduced the *in vivo* and *in vitro* hypofertility observed in the Rc3 males in a more drastic way⁴.

Even though *Tex44*-KO males showed no abnormalities in their testicular histology and in their epididymal sperm count, evoking a normal spermatogenesis, their sperm showed a drastic reduction of motility and important ultrastructural anomalies. In fact, the progression of the *Tex44*-KO sperm through the different stages of maturation in the epididymis was correlated to a progressive deterioration of the morphological phenotype. This latter evolved from a majority of midpiece-principal piece (MP-PP) disjunctions in the caput epididymis to a majority of severe bendings of the flagellum in the cauda epididymis. This could be explained by the fact that during their transit through the epididymis, sperm gradually acquire their motility^{8,9}. And, since *Tex44*-KO sperm present a weakness at the MP-PP junction, the initial acquisition of their mobility leads to a break at this specific region (hairpin bending).

The drastic reduction of *Tex44*-KO sperm motility is a clear consequence of the important morphological sperm abnormalities. Interestingly, the few percentage (<10%) of sperm that do not present morphological abnormalities is nearly the same as the one of motile sperm. These few “normal” sperm could explain the fact that the *Tex44*-KO males are severely hypofertile but could still rarely sire *in vivo* and *in vitro*.

Most of the abnormalities observed on the *Tex44*-KO sperm have already been described previously in the literature and can potentially help us in the comprehension of TEX44's function in mice. They are reminiscent of the MMAF (multiple morphological anomalies of the flagellum) syndrome, a mosaic of defects in sperm flagellum morphology with reduced sperm motility¹⁰.

For example, the absence of SEPTIN4⁸ or TAT1¹¹, that are critical components of the sperm annulus, leads to males that are infertile in knock-out mouse models. These latter show a complete lack of sperm

motility and structurally defective sperm with MP-PP disjunction and hairpin bending of the tail, disruption of the axial structures, absence of annulus and abnormal mitochondrial sheath structure.

The absence of SEPP1, a crucial component of the selenium dietary micronutrient delivery pathway in male germ cells development, shows the same defective phenotype than in the absence of SEPTIN4 and TAT1, but with the maintenance of an annulus¹². However, the mouse knockout of *Cabs1*, a gene coding for a spermatid-specific calcium binding protein, leads to male subfertility with a disorganization of the MP-PP junction and an abnormal annulus.

Interestingly, looking at the STRING database, TEX44 is described as interacting with human TIMM17B, CPT1B^{13,14} and MICOS13 proteins (Detected by validated two hybrid assay). These three proteins are respectively expressed in the inner, the outer and in the cristae mitochondrial membrane. The detection of TEX44 in the midpiece of human sperm may suggest a potential interaction of this protein with the mitochondria present in the sperm midpiece. This could be correlated to the decrease of mitochondrial activity in the KO, detected by the MitoTracker probe. It is interesting to notice that the CABS1 protein mentioned above has been detected in the mitochondrial inner membrane in rat sperm¹⁵.

Even though the knockout of *Tex44* does not really reproduce the phenotype observed in the Rc3 IRCS males (moderate hypofertility, abnormal anchoring of the acrosome to the nucleus and persistence of residual bodies at the sperm midpiece)⁴. It exhibits other alterations (flagellum defects, abnormal mitochondria). Here, we described a new gene, *Tex44*, that is implicated in a reproductive phenotype in mice. Taken all together, our results show that *Tex44* in mice is implicated in the correct set-up of the sperm flagellum during spermatogenesis and more precisely during spermiogenesis. The precise function of TEX44 protein as well as its involvement in humans remains to be investigated.

Materials and Methods

Ethics statement

All animal experiments were performed in accordance with national guidelines for the care and use of laboratory animals. Authorizations were obtained from local (C2EA-34, Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale Paris Descartes) and governmental ethical review committees via the APAFIS Application (Autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques), Authorization APAFIS #14124-2017072510448522 v26, A. Ziyyat (2018–2023).

Generation and breeding of transgenic mice

Tex44 knock-out (KO) mice were generated by the “Institut clinique de la souris” platform of the Institut de génétique et de la biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC) in Illkirch-Graffenstaden, France. RNA guides were selected, produced and tested in vitro. Guides and Cas9 were electroporated into fertilized C57Bl/6N oocytes. Embryos that had passed to the 2-cell stage were transferred into the oviducts of pseudopregnant females. F0 founders of interest were characterized by sequencing of the PCR fragment overlapping the deletion and were bred to obtain germ line transmission. Subsequent genotyping of CRISPR edited founders was performed by PCR amplification on DNA extracted from tail biopsies (NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel, Düren, Germany) using the GoTaq Flexi polymerase (Promega, Madison, WI, USA) under standard PCR conditions using the following primers respectively flanking guides' targets (exon1-F2 5'- GACCCTTGCTCTACAAGTACCTGTG-3' and exon1-R2 5'-TTTGATCTACATCATGTTTCAGCTAG-3', upstream and exon1-F2 5'-GACCCTTGCTCTACAAGTACCTGTG-3' and exon1-R6 5'-GGGCTGAGCAACAGGCAGGTACATG-3' downstream).

PCR-product sequencing (Eurofins Genomics, Les Ulis, France) using the amplification primers (Eurogentec, Liege, Belgium) allowed the identification of the precise event of deletion.

In vivo fertility and fertilization assay

Sexually mature *Tex44*-KO homozygous and wild-type littermates were mated with C57BL/6J females of 7 weeks. The numbers of pups and litters were recorded after 3 weeks of gestation whose beginning was attested by the presence of a vaginal plug after the overnight mating.

Wild-type C57BL/6J female mice of 5–8 weeks (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were injected with 5 IU of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG). After 48h, they were superovulated with 5 IU human chorionic gonadotropin (hCG) (Intervet, Beaucouzé, France) and then mated overnight with pubere WT or *Tex44*-KO males in order to evaluate their capacity to fertilize *in vivo*. The next day, females showing a vaginal plug were sacrificed by cervical dislocation and their oocytes retrieved. The cumulus cells were removed from around the oocytes and the latter were directly mounted in Vectashield/DAPI (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) for observation under UV light (Nikon Eclipse E600 microscope). Oocytes showing at least one fluorescent decondensed sperm head within their cytoplasm were considered fertilized. According to this, the fertilization rate (FR) was evaluated.

Mouse oocyte and sperm preparation for In Vitro Fertilization

Oocyte preparation. Wild-type C57BL/6J female mice of 5–8 weeks (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were superovulated with 5 IU of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and then 48h later with 5 IU human chorionic gonadotropin (hCG) (Intervet, Beaucouzé, France). The next day, about 13 hours after hCG injection, animals were sacrificed by cervical dislocation. Cumulus oocyte complexes were collected by tearing the ampulla wall of the oviduct, placed in Fercult medium (FertiPro N.V, Belgium) supplemented with 3% BSA (Sigma–Aldrich), and maintained at 37 °C under 5% CO₂ in air under FertiCult Mineral Oil (FertiPro N.V, Belgium). When experiments were performed with zona-free oocytes, cumulus cells were first removed by a brief exposure to hyaluronidase IV-S (1 mg/ml, Sigma–Aldrich). Then, the zona pellucida was dissolved with acidic Tyrode’s solution (pH 2.5, Sigma–Aldrich) under visual monitoring. Zona-free eggs were rapidly washed in a Fercult medium, BSA 3% and kept at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere for 2 to 3 hours to recover their fertilization ability.

Sperm preparation. Mouse spermatozoa were obtained from the cauda epididymis of WT or *Tex44*-KO C57BL/6J male mice (from 8 weeks old) and capacitated at 37 °C under 5% CO₂ for 90 minutes in a 500 µl drop of Fercult medium supplemented with 3% BSA, under FertiCult Mineral Oil.

In vitro fertilization

Cumulus-intact or zona-free eggs were inseminated with capacitated spermatozoa, at a final concentration of 10⁶/ml or 10⁵/ml respectively, for 3 hours, in a 50 µl drop of Fercult medium, 3% BSA kept at 37 °C, 5% CO₂, under FertiCult Mineral Oil. At the end of incubation, oocytes were washed and directly mounted in Vectashield/DAPI (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) for observation under UV light (Nikon Eclipse E600 microscope). Oocytes showing at least one fluorescent decondensed sperm head within their cytoplasm were considered fertilized. According to this, the fertilization rate (FR) was evaluated. To assess the fertilization index (FI) in zona-free assay, the number of decondensed sperm heads per oocyte was recorded.

Mouse Sperm Motility Analysis

Sperm motility was assessed by Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) using the CEROS II apparatus (Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA). Mouse spermatozoa samples were obtained from the cauda epididymis of WT or *Tex44*-KO C57BL/6J mice (8 to 10 weeks old) and capacitated at 37 °C under 5% CO₂ for 2 hours in a 500 µL drop of Fercult medium supplemented with 3% BSA, under mineral oil. The movements of at least 2000 sperm cells per sample were analyzed in 20 µm chambers (Leja Products B.V., NieuwVennep, Netherlands) with a Zeiss AX10 Lab. A1 microscope (10× objective), using the HT CASAI software. The settings were as follows: acquisition rate, 60 Hz; number of frames, 45; minimum head brightness, 175; minimum tail brightness, 80; minimum head size, 10 µm²; minimum elongation gate, 1%; maximum elongation gate, 100%; objective magnification factor, 1.2.

Histological analysis, sperm preparation and immunostaining

Testes from adult WT and *Tex44*-KO males were collected and fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS. Samples were dehydrated and embedded in paraffin and cut in serial 5 µm thick sections on a microtome. Testis sections were rehydrated before Hematoxylin-eosin (H&E) staining.

For immunofluorescence staining, sperm suspensions were permeabilized during 10 min in PBS 1×, triton 0.2%, and were then saturated for 1h in PBS-BSA 1% with triton 0.02%, at RT. Then they were incubated for 1 h with a polyclonal anti-SEPTIN4 antibody (HPA021587, Sigma Aldrich) at 1:50 in PBS-BSA 1% with triton 0.02% at RT for 2 h and washed three times in PBS-BSA 1%. A secondary antibody (anti-Rabbit-Alexa 488 at 10 µg/ml, ThermoFischer Scientific) was used at RT during 1 h. After repeated washing with PBS-BSA 1%, a drop of sperm suspension was smeared on a slide, air-dried and mounted with the VECTASHIELD® PLUS Antifade Mounting Medium with DAPI medium (Eurobio Scientific, Les Ulis, France). Detection was performed using a Nikon Eclipse E600 microscope Zeiss Axiophot epifluorescence microscope and images were digitally acquired with a camera (Coolpix 4500, Nikon, Champigny sur Marne, France).

For Papanicolaou staining, sperm were retrieved from cauda epididymes in Ferticult medium and spread onto a Superfrost Plus slide (ThermoFischer Scientific). Sperm cells were fixed by incubation with paraformaldehyde 4% in PBS for 10 min and stained, following the Papanicolaou protocol (Hematoxylin, OG6, EA50). Briefly, the slides were washed in 95% ethanol and inserted in Harris hematoxylin for 3 min for nucleus counterstaining, and washed, stained with OG-6 dye (RAL diagnostics 05.12013, Martillac, France) and with EA-50 (RAL diagnostics 05.12019). Then the slides were dehydrated (95% ethanol absolute ethanol and xylene) and mounted with a permanent mounting medium.

For mitochondrial staining, mouse spermatozoa were obtained from the cauda epididymis of WT or *Tex44*-KO C57BL/6J male mice (from 8 weeks old) and capacitated at 37 °C under 5% CO₂ for 90 minutes in a 500 µl drop of Ferticult medium supplemented with 3% BSA, under Ferticult Mineral Oil. Then, MitoTracker™ Orange CMTMRos (M7510, ThermoFisher) was added to the medium at a concentration of 500 nM for 30 min in the incubator at 37 °C under 5% CO₂. Sperm cells were then spread onto a Superfrost Plus slide (ThermoFischer Scientific). After drying in the dark, sperm cells were fixed by incubation with paraformaldehyde 4% in PBS for 10 min. Since this Mitotracker™ is a probe that passively diffuses across the plasma membrane and accumulates in active mitochondria, the intensity of fluorescence reflects the mitochondrial activity. Detection of fluorescence was performed using a Nikon Eclipse E600 Zeiss Axiophot epifluorescence microscope and images were digitally acquired with a camera (Coolpix 4500, Nikon, Champigny sur Marne, France). The intensity of fluorescence has been normalized with to the background fluorescence of each image.

For the analysis of the sperm morphology, the testis and the three parts of the epididymis (caput/corpus/cauda) were dissected and the spermatozoa were retrieved in M2 medium at 37°C. Sperm samples were washed in PBS 1X- BSA1%, centrifuged at 600 g for 5 min and immediately fixed in 4% Paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, PA, USA) in PBS-1%BSA for 5 min. A drop of sperm suspension was smeared on a slide, air-dried and mounted with Vectashield-DAPI. Detection was performed using a Nikon Eclipse E600 microscope Zeiss Axiophot epifluorescence microscope and images were digitally acquired with a camera (Coolpix 4500, Nikon, Champigny sur Marne, France).

Electron Microscopy

Mouse spermatozoa from males were prepared as described above (IVF) and fixed by incubation in PBS supplemented with 3% glutaraldehyde (Grade I, Sigma) for 2 h at room temperature. Samples were washed twice in PBS and post-fixed by incubation with 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences), then dehydrated by immersion in a graded series of alcohol solutions and embedded in Epon resin (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA). Ultra-thin sections (90 nm) were cut with a Reichert Ultracut S ultramicrotome (Reichert-Jung AG, Wien, Austria) and were then stained with uranyl acetate and lead citrate. Sections were analyzed with a JEOL 1011 microscope and digital images were acquired

with a Gatan Erlangshen CCD camera and Digital Micrograph software. Characterization of the different phenotypes observed was performed through double blind analysis.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM of at least three independent experiments. For statistical analysis, t-Tests were performed using GraphPad Prism version 9.00 for Windows, (GraphPad Software, La Jolla California USA). Differences were considered statistically significant when p-value <0.05 . When data were not normally distributed, a Welch's correction was applied.

References

1. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A. & Chyatte, M. R. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* **13**, 37 (2015).
2. Houston, B. J. *et al.* A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene-disease relationships. *Hum Reprod Update* **28**, 15–29 (2021).
3. Krausz, C. & Riera-Escamilla, A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* **15**, 369–384 (2018).
4. Vatin, M. *et al.* Identification of a New QTL Region on Mouse Chromosome 1 Responsible for Male Hypofertility: Phenotype Characterization and Candidate Genes. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 8506 (2020).
5. Girault, M.-S. *et al.* Deletion of the Spata3 Gene Induces Sperm Alterations and In Vitro Hypofertility in Mice. *Int J Mol Sci* **22**, 1959 (2021).
6. Jumeau, F. *et al.* Human Spermatozoa as a Model for Detecting Missing Proteins in the Context of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *J. Proteome Res.* **14**, 3606–3620 (2015).
7. Bellil, H., Ghieh, F., Hermel, E., Mandon-Pepin, B. & Vialard, F. Human testis-expressed (TEX) genes: a review focused on spermatogenesis and male fertility. *Basic Clin Androl* **31**, 9 (2021).
8. Kissel, H. *et al.* The Sept4 Septin Locus Is Required for Sperm Terminal Differentiation in Mice. *Developmental Cell* **8**, 353–364 (2005).
9. Freitas, M. J., Vijayaraghavan, S. & Fardilha, M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol Reprod* **96**, 2–12 (2017).
10. Coutton, C., Escoffier, J., Martinez, G., Arnoult, C. & Ray, P. F. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Human Reproduction Update* **21**, 455–485 (2015).

11. Touré, A. *et al.* The testis anion transporter 1 (Slc26a8) is required for sperm terminal differentiation and male fertility in the mouse. *Hum Mol Genet* **16**, 1783–1793 (2007).
12. Olson, G. E., Winfrey, V. P., Nagdas, S. K., Hill, K. E. & Burk, R. F. Selenoprotein P is required for mouse sperm development. *Biol Reprod* **73**, 201–211 (2005).
13. Luck, K. *et al.* A reference map of the human binary protein interactome. *Nature* **580**, 402–408 (2020).
14. Rolland, T. *et al.* A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell* **159**, 1212–1226 (2014).
15. Calvel, P. *et al.* CLPH, a novel casein kinase 2-phosphorylated disordered protein, is specifically associated with postmeiotic germ cells in rat spermatogenesis. *J Proteome Res* **8**, 2953–2965 (2009).

Acknowledgements

The authors would like to thank the staff of PHENOMIN – Institut Clinique de la Souris (<http://www.phenomin.fr>) that have made possible the generation of the mouse models, A. Schmitt from the Electron Microscopy Facility (Institut Cochin, Paris), R. Onifarasoaniaina from the HISTIM core facility (Institut Cochin, Paris), J. Lesieur and T. Guilbert from the IMAG'IC core facility (Institut Cochin, Paris). The authors thank P. Lorès and M. Whitfield for providing scientific advice.

VII. Discussion

Ainsi, en partant de l'observation d'un phénotype d'une lignée IRCS qui présentait une globozoospermie partielle, nous avons pu identifier un intervalle de gènes, *Mafq1*, qui serait susceptible de comporter des gènes intervenant dans la spermatogenèse et notamment l'étape de mise en place de l'acrosome. L'étude des lignées IRCS est une approche intéressante pour localiser et déterminer de nouveaux gènes impliqués dans des pathologies (Burgio et al. 2007).

Après analyse de l'intervalle *Mafq1*, nous avons décidé d'étudier de façon successive deux gènes présents dans cet intervalle et qui semblaient être de bons gènes candidats pour être impliqués dans la globozoospermie. Nous avons donc réalisé les KO de ces gènes.

Le premier gène candidat étudié, *Spata3*, a confirmé le rôle potentiel que ce gène pourrait jouer dans l'apparition d'une globozoospermie partielle. En effet, ces mâles KO présentent des défauts de l'acrosome, ce qui est la caractéristique de la globozoospermie. Cependant, le phénotype du KO *Spata3* ne reproduit que partiellement le phénotype des RC3 puisque des différences existent : les mâles KO sont fertiles *in vivo*, et leurs spermatozoïdes n'ont pas de diminution de la mobilité et n'effectuent pas de réaction acrosomique spontanée.

Comme le phénotype des KO *Spata3* est moins sévère que celui des RC3, nous avons émis la première hypothèse que d'autres gènes de cet intervalle pourraient être responsables de l'apparition de cette globozoospermie partielle. Nous nous sommes donc ensuite intéressés à *Tex44*, un gène qui ne figurait pas sur la version du génome disponible au moment du lancement du KO de *Spata3*. Ce modèle KO a quant à lui bien un problème sévère de fertilité *in vivo* et *in vitro* ainsi qu'une mobilité diminuée de ses spermatozoïdes. Cependant, là non plus, ce n'est pas un phénotype de globozoospermie qui a été observée mais une altération du flagelle. En effet, chez les mâles KO *Tex44*, nous avons observé des disjonctions au niveau de la jonction entre les pièces intermédiaire et principale ainsi qu'une désorganisation des doublets de microtubules de la pièce principale. Cependant, malgré les disjonctions observées, la structure de l'annulus, qui se situe à la jonction des pièces intermédiaire et principale, n'est pas altérée. Néanmoins, ces anomalies flagellaires peuvent expliquer une fragilité du flagelle (les flagelles se cassent facilement) et un défaut important de leur mobilité entraînant une forte hypofertilité. Le phénotype observé chez les mâles KO *Tex44* se rapproche ainsi plutôt du syndrome des anomalies morphologiques multiples du flagelle (AMMAF ou MMAF pour Multiple Morphological Abnormalities of the sperm Flagella). En effet, les spermatozoïdes KO *Tex44* rassemblent au moins deux anomalies flagellaires : des malformations de l'axonème avec les disjonctions, le repliement en épingle à cheveux, et l'absence de certains doublets de microtubules, et des malformations de la gaine mitochondriale avec des mitochondries en désordre (Escalier et Touré 2012; W.-L. Wang, Tu, et Tan 2020). Tout comme ce qui a pu être observé lors de notre étude, ces malformations

ont été décrites comme ayant un impact sur la mobilité des spermatozoïdes en les rendant immobiles ou peu progressifs (Escalier et Touré 2012).

Aucun des deux KO étudiés n'a permis de reproduire le phénotype exact observé dans la lignée RC3. Néanmoins, chacun des KO généré nous a permis d'apporter un début de réponse quant aux rôles que ces gènes, jusqu'alors jamais étudiés, jouent dans la spermatogenèse et dans la fécondation et plus précisément au cours de la spermiogenèse : *Spata3* jouerait un rôle dans la mise en place de l'acrosome, *Tex44* quant à lui interviendrait dans l'établissement du flagelle.

Spata3 semble donc intervenir dans la mise en place de l'acrosome mais n'est pas indispensable. Cependant, pour aller plus loin, il serait intéressant de localiser plus précisément SPATA3 mais les outils comme des anticorps fiables manquent. En effet, les spermatozoïdes KO *Spata3* présentent des défauts d'acrosome mais également des gouttelettes lipidiques dans des corps résiduels persistants. Ces dernières peuvent résulter d'un problème métabolique ou d'un défaut d'élimination des corps résiduels par les cellules de Sertoli. Par exemple, le KO *Gba2*, gène qui code une enzyme du réticulum endoplasmique intervenant dans le métabolisme glucosylcéramide, entraîne une accumulation de glucosylcéramide dans les cellules de Sertoli. Ceci serait à l'origine d'un défaut de transport des glycolipides depuis les cellules germinales vers les cellules de Sertoli, ce qui engendrerait des anomalies morphologiques de la tête spermatique. Les mâles KO *Gba2* sont globozoospermiques, avec la présence d'acrosomes anormaux et une mobilité de leurs spermatozoïdes diminuée. Tout ceci entraînant leur hypofertilité (Yildiz et al. 2006). On peut alors se poser la question de la fonction exacte que remplit SPATA3 dans la mise en place de l'acrosome : s'il intervient dans la régulation du trafic vésiculaire, dans l'ancrage de l'acroplaxome au noyau, dans le complexe acrosome-acroplaxome-manchette et/ou encore dans le métabolisme des lipides ou leur transport entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli. Malheureusement, la séquence de la protéine SPATA3, tout comme celle de TEX44, n'est d'aucune utilité pour prédire une fonction. Les familles TEX et SPATA sont de vastes catalogues de protéines testiculaires sans réelles ressemblance entre elles.

Tex44 semble quant à lui intervenir dans la mise en place du flagelle. Les spermatozoïdes KO *Tex44* présentent des disjonctions au niveau de la jonction entre les pièces intermédiaire et principale, sans affecter la structure l'annulus, et ont de ce fait une mobilité altérée. Ceci induit une fertilité des mâles fortement diminuée. Aucune anomalie de l'acrosome n'a été relevée lors de l'étude du modèle KO *Tex44*, le lien entre le phénotype RC3 et le phénotype KO *Tex44* ne semble pas validé. Il a été décrit dans la littérature que des mutations des composants du trafic intra-flagellaire et des protéines associées à la manchette conduisent à des altérations de la morphologie de la tête spermatique et du flagelle (défauts d'élongation) (Hwang et al. 2021; Liu et al. 2018; O'Donnell et al. 2012; Mari S. Lehti, Kotaja, et Sironen 2013). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que TEX44 pourrait intervenir dans la mise en place du complexe acrosome-acroplaxome-manchette et que son absence ou sa mutation engendre des altérations de la morphologie du flagelle induisant une diminution de

la mobilité des spermatozoïdes et de ce fait une diminution de la fertilité des mâles. Pour préciser le rôle de TEX44 dans la mise en place du flagelle, il pourrait être intéressant d'avoir un anticorps immuno-précipitant fiable à disposition afin de rechercher ses partenaires qui, s'il s'agit de protéines déjà décrites, nous orienteraient vers le processus dans lequel intervient TEX44.

La génération de ces deux lignées KO ne nous a donc pas permis de reproduire le même phénotype que celui observé dans la lignée RC3. Ceci peut s'expliquer par le fait que la génération d'un KO peut engendrer un phénotype différent de celui induit par une mutation. En effet, dans la lignée RC3, les différences de séquence de *Spata3* ou *Tex44* entre les versions du génome B6 et *Spretus* peuvent être assimilées à des variants ou des mutations. Ainsi, notre modèle KO, et donc l'absence de la protéine, est peut-être moins délétère que la présence d'une mutation. En absence d'une protéine, un phénomène de compensation peut se mettre en place afin de pallier le manque et ne pas entraîner de défaut d'une fonction. A l'inverse, la mutation d'une protéine peut être bien plus délétère notamment si la mutation se situe au niveau d'un site actif ou d'interaction, ceci peut entraîner la déstabilisation d'un complexe entier. Ainsi, il aurait pu être intéressant de faire de la mutagenèse dirigée afin de mimer la version *Spretus* du gène et reproduire les quelques changements d'acides aminés dans le fond génétique B6, et ainsi se rapprocher au plus près du génotype de la lignée RC3.

Afin de tenter de reproduire au mieux la lignée RC3, nous pourrions envisager en théorie de réaliser une lignée double KO des gènes *Spata3* et *Tex44*. Ceci nous permettrait d'observer si le phénotype qui en résulterait se rapprocherait plus du phénotype des RC3. La réalisation de ce KO nécessiterait à nouveau d'utiliser la technique CRISPR/Cas9 à partir d'individus appartenant à l'une de ces deux lignées. En effet, même si nous possédons les deux lignées KO indépendamment l'une de l'autre, nous ne pourrions pas obtenir un double KO en croisant les deux lignées car ces gènes sont présents dans le même intervalle *Mafq1*. De ce fait, il ne serait donc pas possible d'obtenir ce double KO par recombinaison homologe. Cependant, le phénotype des KO *Tex44* compromet l'utilité de cette démarche.

L'étude des gènes de l'intervalle *Mafq1* pourrait être poursuivie. Tout d'abord, en faisant une mise à jour des données connues concernant les gènes de cet intervalle, tant sur les données bibliographiques (étude de la fonction du gène, KO réalisé, ...) que sur les données génomiques (séquence, isoformes, ...). Tout cela permettrait de mettre ainsi à jour la liste des gènes candidats qui seraient intéressants à étudier si cela nous semble pertinent. Un intérêt particulier pourrait être porté aux gènes non codants que nous n'avons pas considérés comme candidats mais qui pourraient moduler l'expression d'autres gènes ou s'avérer importants dans les mécanismes de la spermatogenèse.

Par ailleurs, le QTL *Mafq1* comme nous l'avons défini fait environ 4 Mb. Avec les moyens désormais à notre disposition comme des SNP cartographiés de façon extensive, la taille de l'intervalle pourrait éventuellement être réduite, la sélection de gènes candidats améliorée. Des analyses de type transcriptomique auraient pu permettre d'établir une image

des dérégulations géniques entraînées par la présence du fragment *Mafq1*. Néanmoins, la lignée n'est plus disponible et ne pourra pas être plus caractérisée qu'elle ne l'a été.

En parallèle, l'étude du génome de patients pourrait nous permettre de savoir si des mutations dans les gènes *SPATA3* ou *TEX44* pourraient expliquer certaines hypofertilités ou infertilités masculines dont l'origine n'a pas encore pu être identifiée. A ce jour, aucun cas d'un patient porteur d'une telle mutation n'a été rapporté. Les patients globozoospermiques et MMAF qui n'ont pas fait l'objet d'analyses d'exomes et qui ne portent pas de mutation dans les gènes connus comme *DNAH1* pour les MMAF ou *DPY19L2* pour la globozoospermie pourraient être séquencés pour les gènes *SPATA3* et *TEX44* respectivement.

Pour conclure, cette étude ne nous a pas permis d'élucider entièrement les causes du phénotype observé dans la lignée RC3. Cependant, elle nous a tout de même permis de pouvoir identifier deux nouveaux gènes, jusqu'alors non décrits. Ces deux gènes d'intérêt jouent des rôles différents. *Spata3* est en relation avec le phénotype de globozoospermie partielle observé dans la lignée RC3 en présentant des défauts de l'acrosome. *Tex44* apparaît quant à lui être impliqué, non pas dans une anomalie morphologique de la tête mais plutôt du flagelle, révélant une relation avec les MMAF. Ces deux gènes semblent donc tout deux impliqués dans des pathologies de type tératozoospermie.

Partie 3 : Recherche d'une protéine impliquée dans l'interaction gamétique à partir de l'étude du cas d'un patient infertile

I. Contexte de l'étude : Cas d'un patient infertile

Jusqu'alors les protéines décrites comme essentielles à l'interaction gamétique sont impliquées dans l'étape d'adhésion. A ce jour, aucune protéine essentielle à la fusion des gamètes n'a été identifiée. La quête de cette protéine fusogène est une démarche difficile à cause de la difficulté d'accès au matériel gamétique adéquat, au caractère transitoire de cette étape, et est pour l'instant infructueuse. Les modèles souris KO de ces protéines essentielles à l'adhésion gamétique engendrent des individus (mâle ou femelle suivant le gène délété) infertiles. De plus, dans ces modèles, lors de réalisation de FIV, on observe l'absence de fusion gamétique et de ce fait les spermatozoïdes s'accumulent dans l'espace périvitellin sans parvenir à fusionner avec l'ovocyte (Inoue et al. 2005; Bianchi et al. 2014; Barboux et al. 2020; Noda et al. 2020; Lamas-Toranzo et al. 2020; Fujihara et al. 2020; Inoue, Hagihara, et Wada 2021; Noda et al. 2022; Lorenzetti et al. 2014). Chez l'Humain, le rôle de certaines de ces protéines dans la fécondation a été confirmé par la réalisation de FIV humaine en présence d'anticorps bloquants (Ziyyat et al. 2006; Jean et al. 2019; Barboux et al. 2020). Cependant, malgré cette implication validée *in vitro*, aucun cas de patient infertile présentant une mutation d'un de ces gènes essentiels à l'adhésion gamétique n'a été rapporté. De plus, cette accumulation de spermatozoïdes dans l'espace périvitellin n'avait jusqu'alors pas encore été décrite chez l'espèce humaine. Ce n'est qu'en 2018 que le cas d'un patient infertile présentant ce phénotype a été décrit (Sha et al. 2018).

C'est au cours de sa prise en charge pour une aide médicale à la procréation que le cas de ce patient infertile a été découvert. En effet, les FIV réalisées ne permettaient pas d'obtenir d'embryon et les spermatozoïdes du patient traversaient la zone pellucide puis s'accumulaient dans l'espace périvitellin. Ce n'est que la réalisation d'une ICSI qui a finalement permis au couple de concevoir un enfant.

L'équipe d'AMP ayant pu observer ce phénotype a souhaité poursuivre l'étude du cas de ce patient afin d'en déterminer la cause. Pour cela, ils ont réalisé l'exome du patient infertile, puis analysé ce dernier afin de rechercher des variants rares qui pourraient être responsables du phénotype observé chez ce patient. Cela leur a permis de mettre en évidence une mutation hétérozygote du gène *ADAM20* (*A Disintegrin And Metalloprotease 20*). Grâce à un immunomarquage de la protéine ADAM20, ils ont observé qu'ADAM20 était principalement localisée en cercle autour de la tête spermatique (ring structure) sur les spermatozoïdes contrôles, ainsi que faiblement exprimé au niveau de l'acrosome. Sur les spermatozoïdes du patient, la localisation d'ADAM20 en cercle autour du noyau et sur

l'acrosome n'est pas présente. Un marquage très faible, quasiment de l'ordre du bruit de fond, semblait observable le long du flagelle.

L'hypothèse émise par les auteurs était que la mutation *ADAM20* serait à l'origine d'un changement de localisation de la protéine, affectant ainsi la fonction d'*ADAM20*. Selon eux, la mutation d'*ADAM20* serait donc le facteur responsable du défaut d'interaction gamétique observé, induisant un phénotype d'infertilité. *ADAM20* pourrait donc être une protéine essentielle de l'interaction gamétique et son rôle dans l'adhésion ou la fusion des gamètes reste à déterminer.

II. *Adam20, Adam25, Adam39*

Dans l'article de 2018 décrit précédemment, le patient infertile présentait une mutation du gène *ADAM20*. Il nous a paru important d'explorer la fonction d'*Adam20* par un modèle animal. Selon la base de données ENSEMBL⁹, le gène *ADAM20* humain possède trois orthologues chez la souris : *Adam20*, *Adam25* et *Adam39*. Chez la souris, *Adam25* est situé sur le chromosome 8, immédiatement suivi par deux autres membres de la famille des ADAMs : *Adam20* et *Adam39*. Ces trois ADAMs présentent une très forte homologie avec entre 90 et 95% d'homologie au niveau génomique et entre 80 et 90% d'homologie au niveau protéique. En plus, les protéines murines *ADAM20*, *ADAM25* et *ADAM39* présentent elles aussi un peptide fusogène putatif (Figure 20).

ADAM20human	GRVQCENVGVIPNLIHSTVQQFHLND	27
ADAM20mouse	GRVQCENVTRIPFLRDHSTVHWTHLNG	27
ADAM39mouse	GRVQCENVTRIPFLRDHSTVHWTHLNG	27
ADAM25mouse	GRVQCENVAHIPFLRDHSTVHWTHLNG	27
	***** ** * :****: ***	

Figure 20 : Alignement des séquences des peptides fusogènes putatifs des protéines *ADAM20* humain, et des protéines murines *ADAM20*, *ADAM25* et *ADAM39*

Clustal Omega : www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo

Chez la souris, sur le chromosome 8, plusieurs membres de la famille ADAM sont présents. Ainsi, on retrouve *Adam18*, *3*, *5*, *32*, *9*, *24*, *25*, *20*, *39*, *26b*, *26a*, *34*, et *29*. Parmi eux, 4 membres sont situés les uns à la suite des autres : *Adam24* (Testase 1), *Adam25* (Testase 2), *Adam20* (Testase 8) et *Adam39* (Testase 9). *Adam24* a déjà été étudié et il jouerait un rôle dans le blocage à la polyspermie (Zhu et al. 1999; Zhu, Myles, et Primakoff 2001; Zhu et al.

⁹ <https://www.ensembl.org/index.html>

2009). De plus, *ADAM25* est un pseudogène chez l'humain, et *ADAM39* n'y est quant à lui pas référencé (Edwards, Handsley, et Pennington 2008).

ADAM20, en plus de présenter une mutation chez un patient infertile (Cf. § Partie 3 - I), est exprimé spécifiquement dans le testicule (Figure 21). De plus, *ADAM20*, possède comme toutes les protéines de la famille ADAM, des motifs désintégrine et enrichi en cystéines qui lui permettent d'avoir la capacité d'adhérer aux intégrines (Edwards, Handsley, et Pennington 2008). Enfin, *ADAM20* possède dans sa séquence un peptide fusogène putatif laissant supposer que cette protéine pourrait jouer un rôle dans la fusion cellulaire (Wolfsberg et al. 1995; van Huijsduijnen 1998).

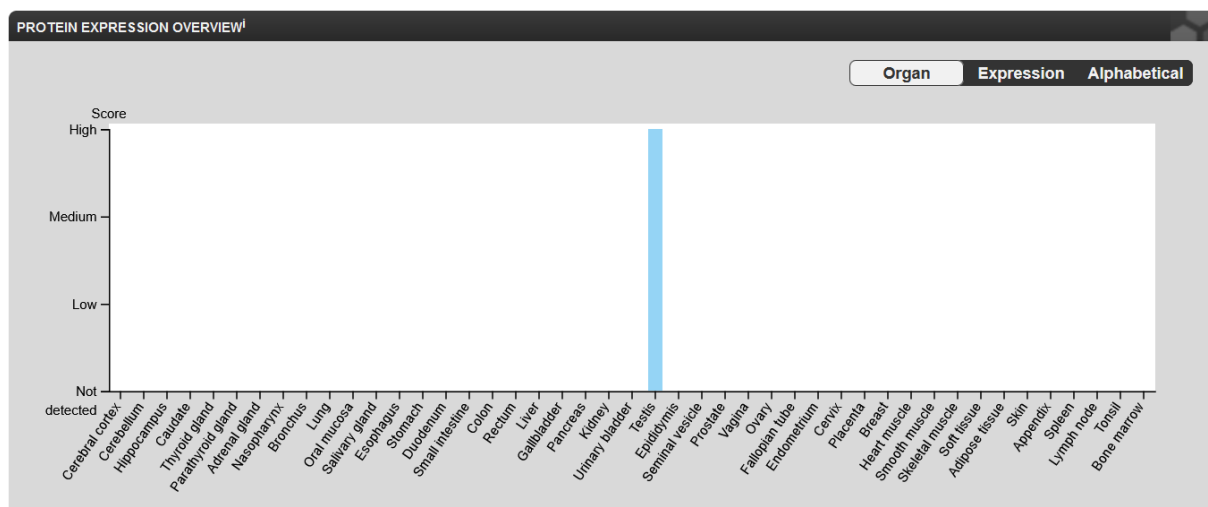


Figure 21 : *ADAM20* est exprimé spécifiquement dans le testicule
Données issues de *Human Protein Atlas* : www.proteinatlas.org

L'ensemble de ces arguments nous ont poussé à étudier le rôle d'*ADAM20* dans l'adhésion et/ou la fusion des gamètes. Pour cela, nous avons étudié le rôle d'*ADAM20* dans la fécondation humaine avec les rares outils possibles et plus extensivement dans un modèle souris. Concernant l'étude chez la souris, nous avons choisi de générer un modèle KO du gène *Adam20*. Or, *Adam20*, *Adam25* et *Adam39* sur le chromosome 8 murin seraient des gènes issus d'un processus de duplication qui pourrait engendrer un phénomène de redondance dans le génome murin (Zhu et al. 1999; I. Choi et al. 2004). Cette redondance pourrait permettre de s'assurer que l'information génétique portée par ces gènes soit bien transmise aux générations suivantes, et que le niveau d'expression d'une protéine cruciale soit toujours assuré. Ainsi, la génération du KO *Adam20* pourrait ne pas suffire à observer un phénotype qui serait masqué par l'expression des gènes *Adam25* et *Adam39*. C'est pourquoi nous avons décidé de réaliser deux lignées KO : l'une qui présente une délétion d'*Adam20* seul et l'autre dans laquelle les gènes *Adam25*, *Adam20* et *Adam39* sont entièrement délétés.

Concernant l'étude d'*ADAM20* chez l'humain, nous avons réalisé des marquages immunofluorescents d'*ADAM20* et d'*IZUMO1* sur des spermatozoïdes humains. Nous avons

pu observer que les marquages diffèrent suivant le statut acrosomal des spermatozoïdes (Cf. Article N° 4 – Figure 1). En effet, lorsqu'ils sont acrosomes intacts, le marquage ADAM20 n'apparaît pas (seulement un peu de marquage aspécifique sur le flagelle). A l'inverse, lorsqu'ils sont acrosome réagi avec un marquage IZUMO1 sur le segment équatorial suite à sa relocalisation lors de la réaction acrosomique, ADAM20 est également localisé sur le segment équatorial des spermatozoïdes. De plus, on peut également l'observer en marquage punctiforme sur la membrane acrosomale interne au pôle antérieur du spermatozoïde (devenue membrane plasmique après la réaction acrosomique), là où se situait l'acrosome avant la réaction acrosomique. Nous observons donc une relocalisation d'ADAM20 après la réaction acrosomique similaire à celle observée pour IZUMO1 qui est une protéine essentielle de l'adhésion gamétique. Ainsi, ADAM20 se trouve sur le segment équatorial après la réaction acrosomique, là où l'interaction gamétique est initiée. Ensuite, nous avons réalisé des expériences de fécondation *in vitro* avec des ovocytes dépellucidés et des spermatozoïdes humains en présence ou non d'un anticorps dirigé contre ADAM20. L'index de fécondation en présence de l'anticorps anti-ADAM20 apparaît significativement diminué par rapport à ceux des contrôles réalisés (Cf. Article N° 4 – Figure 2). En effet, cet index est de $17,3 \pm 1,73$ spermatozoïdes par ovocyte lorsque qu'aucun anticorps n'est incubé avec les gamètes, et il est de $15,5 \pm 2,04$ spermatozoïdes par ovocyte dans la condition où un anticorps contrôle (IgG contrôle de lapin) est présent dans la goutte de fécondation. Lorsque l'anticorps anti-ADAM20 est présent avec les gamètes lors de la fécondation *in vitro*, l'index de fécondation chute et n'est plus que de $4,6 \pm 0,97$ spermatozoïdes par ovocyte. Ainsi, la fécondation *in vitro* humaine apparaît inhibée par la présence de l'anticorps dirigé contre ADAM20. Ce résultat suggère qu'ADAM20 joue un rôle dans l'adhésion et/ou la fusion des gamètes.

Dans l'autre versant du projet, sur le modèle murin, nous avons souhaité étudier *in vivo*, d'une part le rôle d'*Adam20* seul, mais également celui d'*Adam25*, *20* et *39* au cas où les gènes *Adam25* et *39* joueraient un rôle de redondance dans le premier KO et masqueraient ainsi un phénotype. Dans un premier temps, nous avons donc généré la lignée KO *Adam20*. Tout d'abord, nous avons réalisé des tests de fertilité *in vivo* en mettant en accouplement des femelles WT avec des mâles WT ou KO *Adam20*. Les mâles WT ont obtenu des portées de $6,7 \pm 0,58$ bébés par portée ($n = 10$) et les mâles KO *Adam20* ont, quant à eux, obtenu $5,4 \pm 0,71$ bébés par portée ($n = 12$) (Cf. Article N° 5 – Figure 3). Ainsi, aucune différence significative de la taille des portées n'a été observée lors de ces tests, indiquant que le gène *Adam20* n'est pas essentiel pour l'interaction gamétique. Ensuite, nous avons poursuivi l'étude en réalisant des tests de fertilité *in vitro*. Les résultats de ces FIV en cumulus-intact et en zona-free ont quant à eux montré que les mâles KO *Adam20* présentaient une hypofertilité *in vitro* (Cf. Article N° 5 – Figure 4). En effet, avec les mâles WT le taux de fécondation obtenu en FIV en cumulus-intact était de $45,6 \pm 3 \%$ d'ovocytes fécondés ($n = 281$) alors qu'il n'était que de $17,0 \pm 2,3 \%$ ($n = 265$) pour les mâles KO *Adam20*. De la même façon, en FIV en zona-free, l'index de fécondation était réduit pour les mâles KO *Adam20* avec $0,65 \pm 0,05$ spermatozoïde par ovocyte ($n = 161$) alors qu'il était de $0,96 \pm 0,05$ ($n = 162$) avec les mâles WT. Ce résultat indique que même si *Adam20* n'est pas essentiel à l'interaction gamétique, il semble tout de

même jouer un rôle dans le processus de fécondation. Par ailleurs, nous avons réalisé d'autres analyses de ces mâles KO (analyse des spermatozoïdes au CASA et en microscopie électronique, data non montrées) et aucune autre anomalie n'a été décelée. Dans ce modèle KO *Adam20*, les gènes *Adam25* et *Adam39*, très homologues à *Adam20*, sont toujours présents. Ils pourraient donc participer à un phénomène de redondance afin de sécuriser la fonction d'ADAM20.

Dans un second temps, nous avons généré la lignée KO *Adam25-20-39*. Nous avons procédé à la même étude que pour l'analyse du KO *Adam20*, à savoir des tests de fertilité *in vivo* et *in vitro*. La taille des portées obtenues avec les mâles KO *Adam25-20-39* n'était pas différente de celle obtenues avec les mâles WT (Cf. Article N° 5 – Figure 6). En effet, les mâles KO *Adam25-20-39* ont eu $8,0 \pm 0,57$ bébés par portée et les mâles WT en ont eu $6,9 \pm 0,68$. Les tests de fertilité *in vitro* ont montré que tout comme le KO *Adam20*, les mâles KO *Adam25-20-39* sont hypofertiles *in vitro* (Cf. Article N° 5 – Figure 7). Le taux de fécondation en FIV en cumulus intact passe de $53,8 \pm 2,7$ % d'ovocytes fécondés pour les mâles WT (n = 305) à $30,5 \pm 2,7$ % pour les mâles KO *Adam25-20-39* (n = 298). De la même façon, l'index de fécondation était de $1,28 \pm 0,05$ spermatozoïdes par ovocyte (n = 170) alors qu'il n'était que de $0,92 \pm 0,05$ (n = 181) avec les mâles KO *Adam25-20-39*. Par ailleurs, nous avons réalisé d'autres analyses de ces mâles KO (analyse des spermatozoïdes au CASA et en microscopie électronique, data non montrées) et aucune autre anomalie n'a été décelée.

Ainsi, le phénotype de fertilité (*in vivo* et *in vitro*) des deux lignées KO générées est identique. Leur fertilité *in vivo* n'est pas affectée, mais les mâles KO sont hypofertiles *in vitro*. Le KO des gènes *Adam25-20-39* n'engendre pas un défaut de fertilité plus important que le KO du simple gène *Adam20*. La seule absence d'*Adam20* est suffisante pour engendrer une hypofertilité des mâles *in vitro*, et la délétion supplémentaire des gènes *Adam25* et *Adam39* n'aggrave pas ce phénotype.

III. Article N°4

ADAM20 participates to human fertilization

Manuscrit en préparation

Marie-Sophie Girault, Sophie Dupuis, Ahmed Ziyat et Sandrine Barbaux

ADAM20 participates to human fertilization

Marie-Sophie Girault¹, Sophie Dupuis¹, Ahmed Ziyat^{1,2,†}, Sandrine Barbaux^{1*,†}

¹ Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014 PARIS, France.

² Service d'Histologie, d'Embryologie, Biologie de la Reproduction, AP-HP, Hôpital Cochin, F-75014 PARIS, France

* Correspondence: sandrine.barbaux@inserm.fr.

† Contributed equally to this work

Abstract

A mutation of the *ADAM20* gene has been described in an infertile patient whose spermatozoa were observed accumulating in the perivitelline space of oocytes. To validate the role of ADAM20 in human fertilization, we used an antibody against this protein during zona free *in vitro* fertilization assay. When ADAM20 was targeted, the fertilization index was importantly reduced, confirming the role of DAM20 in the adhesion and fusion stages of fertilization.

1. Introduction

Fertilization, which enables the continuity of the species, is a complex process implying many proteins both on the oocyte and the spermatozoa. Indeed, several steps are necessary to perform this mechanism. Spermatozoa migrate through the female genital tract, acquiring their capacity to fertilize the oocyte. When spermatozoa reach the oocyte, they need to cross two barriers that protect it, the cumulus cells and the zona pellucida. Then, the two gametes can directly interact, a spermatozoon adheres to the oocyte, and finally gametes fuse together. To date, about ten proteins are known to play a critical role in the adhesion of gametes. Three of them are present on the oocyte, and seven others are spermatogenic. Among the most studied ones, CD9 plays a major role as a molecular organizer of the oocyte membrane [1,2]. JUNO on the oocyte and IZUMO1 on the sperm head form a ligand/receptor couple directly involved in adhesion of gametes [3,4]. Recently, another protein of the oocyte, named MAIA, has been described to interact with JUNO, and secondly replace it in its interaction with IZUMO1 [5]. All the other proteins described as essentials for the fertilization process are spermatogenic : SPACA6 (Sperm acrosome associated 6), SOF1 (Sperm-oocyte fusion required 1), TMEM95 (Transmembrane protein 95), FIMP (Fertilization Influencing Membrane Protein) and DCST1/2 (Dendrocyte expressed seven transmembrane protein domain-containing) [6–13]. All those proteins essential for fertilization are directly, or indirectly, involved in the adhesion of the spermatozoa with the oocyte. But, to date, the gamete fusion process remains unknown and no protein has been described playing a role in the fusion step. However, the fertilization mechanism is a very complex process, implying several proteins, interacting together, probably localized both on the sperm head and on the oocyte membrane. Up to now, it remains impossible to describe the whole process of fertilization. Indeed, other proteins are likely to be implied in the complex molecular structure required for the adhesion of gametes and proteins that are required for the fusion step still need to be discovered. A common phenotype was found when the Knock-out (KO) of each of these genes was generated, mice are infertile (female or male depending which gene was deleted) and spermatozoa succeed to cross the zona pellucida but not to fuse with oocyte membrane, and therefore accumulate in the perivitelline space. Some of those proteins are also involved in human fertilization, proven by the use of inhibitory antibodies in human *in vitro* fertilization (IVF) assays ([4,6,14]). Despite this involvement, no case of infertile patient presenting a mutation of one of these genes has been described for now. Moreover, the phenotype of spermatozoa accumulating in the perivitelline space, as part of human IVF in Assisted Reproduction Techniques (ART), was never reported until 2018 (ref). Recently, Sha et al reported the unique case of an infertile patient presenting with spermatozoa

accumulating in the perivitelline space [15]. Patient's spermatozoa could cross the zona pellucida but did not succeed to adhere or fuse with oocytes. This issue has been solved by bypassing the adhesion/fusion of gametes with an intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedure. The embryo thereby generated was transplanted and a successful pregnancy followed with the live birth of a child. Furthermore, investigations of the cause of this patient's infertility continued with a whole-exome sequencing, applying some specific filters, to detect rare variants. Among the variants detected, a nucleotidic change in the *ADAM20* (A Disintegrin And Metalloprotease 20) gene seemed to be very interesting and was considered as responsible of the patient's infertility. Sequencing allowed to confirm the heterozygous variant in *ADAM20* gene of the patient, inherited from his mother and altering a highly conserved amino acid. In addition, an immunostaining of ADAM20 on sperm was performed by the authors. In the control, ADAM20 present a ring localization around the head of the spermatozoa, and on the acrosome (marked weakly). This staining is no longer present in the case of the patient. All these data suggest that this mutation of *ADAM20* could result in a localization (addressing) defect of ADAM20 and infertility. However, the role of ADAM20 still remains unknown. ADAM20 belongs to the ADAM family. This is a highly conserved and large family of proteins. These proteins share common structures and domains such as a metalloproteinase or a cysteine-rich domains. Some ADAM proteins have been described playing a role in fertilization and in myoblast or trophoblast fusion [16–18]. ADAM20, in addition to its testis specific expression, contains a disintegrin pattern, as other proteins of the ADAM family. Moreover, ADAM20 comprises in its sequence a putative fusogenic peptide. These characteristics could give a role to ADAM20 in adhesion, with its disintegrin domain, or fusion, with its fusogenic peptide, of gametes. We therefore decided to explore the role of ADAM20 in human fertilization and especially during the adhesion and fusion of gametes. First, we confirmed the localization of ADAM20 on human spermatozoa depending of their acrosomal status. Then, we performed human IVF in the presence or absence of antibodies directed against ADAM20. We observed a fertilization index significantly reduced when the antibody was used. This study confirms a potential role of ADAM20 in human fertilization and more specifically during the adhesion and/or fusion process of gametes.

2. Results

2.1. Labelling

Human spermatozoa were labelled with an anti-ADAM20 antibody, together with an anti-IZUMO1 to compare their localization. The presence of both proteins was simultaneous on the equatorial segment of acrosome-reacted sperm (Figure 1). Punctiform spots were also visible as remnants of the acrosome. Therefore, ADAM20 and IZUMO1 seem to have similar expression patterns in human sperm.

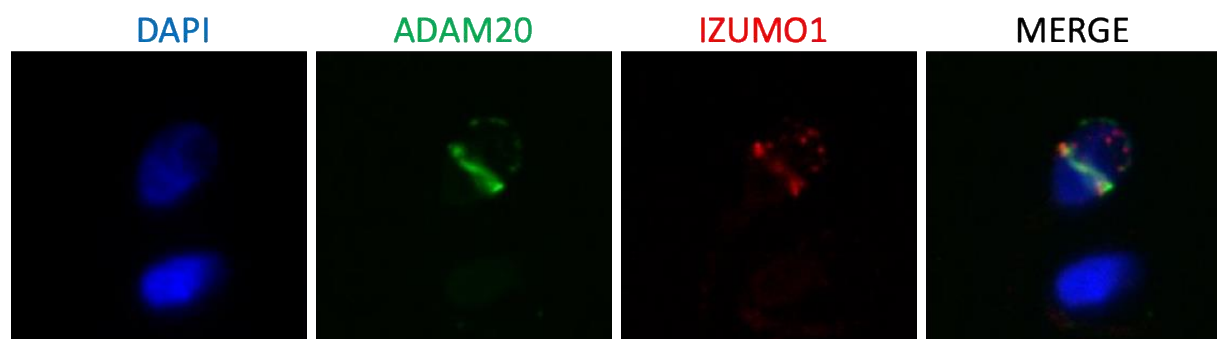


Figure 1 : Labelling of ADAM20 and IZUMO1 on human sperm

2.2. Fertilization index is reduced in presence of anti – ADAM20 antibody

To study the involvement of ADAM20 in the adhesion and/or fusion step during fertilization, *in vitro* fertilization (IVF) assays were performed in presence or not of an anti-ADAM20 antibody or a Rabbit IgG control. IVF assessed for research are exclusively zona-free IVF, which means on depellucidated oocytes. The Fertilization Index (FI) was $17.3 (\pm 6.7)$ sperm heads per oocyte ($n=15$) when no antibody was added in the fertilization drop (Figure 2). The FI is similar when a Rabbit IgG control antibody was used (15.5 ± 6.4) ($n=10$) (Figure 2). When an anti-ADAM20 antibody was incubated with sperm and oocytes during IVF, fertilization was significantly decreased with a FI of $4.6 (\pm 3)$ sperm per oocyte ($n=11$) ($p < 0.0001$) (Figure 2). According to this result, human IVF was inhibited by the use of the anti-ADAM20 antibody. This inhibition suggests that ADAM20 plays a role in the adhesion and/or fusion of spermatozoa and oocyte in humans.

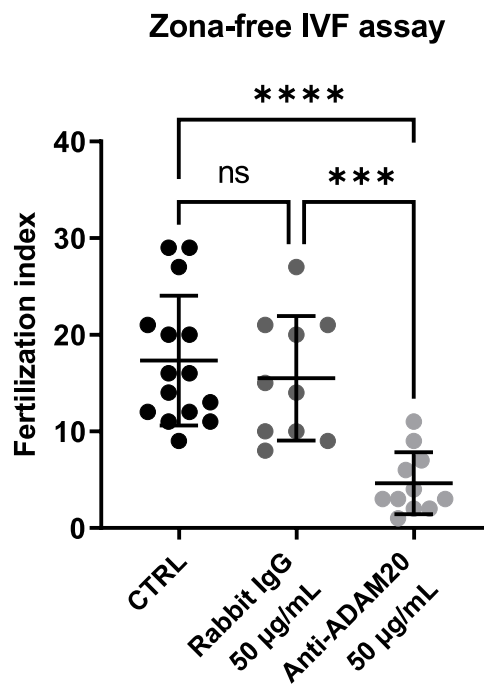


Figure 2: Human *in vitro* fertilization assay. The fertilization index was assessed by zona-free IVF assay at 10^5 sperm per ml, in the presence or absence of an anti-ADAM20 antibody and of a control rabbit IgG. The FI is reduced when ADAM20 is targeted by a specific antibody. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

3. Discussion

We investigated the role of ADAM20 in human fertilization, specially at the step of adhesion and fusion of spermatozoa with oocyte. We observed a fertilization severely reduced when an anti-ADAM20 antibody is present during the IVF.

The patient described by Sha et al had a heterozygous mutation of *ADAM20* that may explain his infertility, the accumulation of sperm in the perivitelline space and the incapacity of sperm to fuse with the oocyte. We could not access the results of whole exome sequencing to confirm the heterozygous mutation of *ADAM20* as the only interesting variant in the patient's exome or to identify additional potential variants.

It is known that proteins of the ADAM family can form complex together, as homo- or heterodimer or forming multiple complex containing 3 or more proteins [19]. It is possible that this heterozygous mutation of *ADAM20* may generate a destabilized protein complex (or a localization/addressing

defect), triggering a defect in the physiological process. Mutation could be more deleterious than an absence of the protein. In the case studied, the mutation generates the substitution of a highly conserved amino acid localized in the pro-domain (which is important for its catalytic activity) or the metalloproteinase domain, depending of the isoform of ADAM20 and the chosen database. In this context, the mutation may trigger a defect in the catalytic action of ADAM20 which could not cleaved a downstream protein. This mutation could modify or inactivate the metalloproteinase domain of ADAM20, which may have consequences on the processing of others proteins. The absence of the protein, that could be replaced in the complex by another protein having the same characteristics, could be less deleterious and could allow the physiological process to succeed.

Research on human gametes is limited and only IVF on depellucidated oocyte is allowed by French bioethics laws (so no embryos can be created because of polyspermia). We could not test if the anti-ADAM20 antibody may reproduce the same phenotype observed during the patient's IVF, with an accumulation of sperm in the perivitelline space and no fertilization.

On zona-free IVF, the anti-ADAM20 reduced the FI. The antibody may block ADAM20, preventing it from performing its function correctly or limiting its capacity to interact with the oocyte membrane to promote adhesion and/or fusion of gametes.

In addition, there is not a total absence of fertilization with the anti-ADAM20 antibody but a severely reduced FI. This could be explained by an affinity problem, an insufficient concentration of antibody (there is no blocking of aspecific sites so the antibody can be fixed on those sites), the agglomeration of antibodies together, or several antibodies on the same spermatozoa, then less antibodies are disponible to block all spermatozoa.

Given the result that the anti-ADAM20 antibody reduced significantly the FI in human zona-free IVF, it appears necessary to produce a KO-*Adam20* mouse model to study how Adam20 works and its role in fertilization.

Nowadays, no mutation of genes known to be essentials for fertilization have been described in human. The precise phenotype of sperm accumulation in the perivitelline space could be observed in humans only after IVF observation or embryoscope follow-up, and has therefore never been reported before the article of Sha et al. The more systematic use of exome analyses might reveal some mutations in these genes also in human patients.

4. Materials and Methods

4.1. Labelling

Human sperm were incubated during approximately 18 hours (overnight) in Ferticult medium (FertiPro, Beernem, Belgium) supplemented with 3% bovine serum albumin (BSA), and maintained at 37°C under 5% CO₂ in air, under Ferticult Mineral oil (FertiPro, Beernem, Belgium). During this time, sperm were co-incubated with anti-IZUMO1 nanobody at 12.5 µg/mL and anti-ADAM20 antibody (PA5-63714, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 5 µg/mL. Spermatozoa were washed 3 times with Ferticult medium, BSA 3%, for 5 minutes, at 600 G, at room temperature. They were then co-incubated with Alexa Fluor 594 – conjugated anti-Alpaga IgG, VHH domain (128-585-232, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA 19390, États-Unis) at 1.7 µg/mL and Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG (A11008, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 5 µg/mL. Spermatozoa were then washed 3 times with PBS 1X, BSA 1%, for 5 minutes, at 600 G, at room temperature. They were then fixed in PBS 1X, PFA 4% during 10 minutes at room temperature before 3 washes. Treated spermatozoa were spread on slides, mounted with Vectashield medium including DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and observed on a confocal spinning-disk (Leica Microsystems, Wetzlar Allemagne).

4.2. Human gametes and *in vitro* fertilization

Human sperm and oocytes were donated by patients undergoing an assisted reproductive technology (ART) program for *in vitro* fertilization (IVF) or ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) in the assisted reproductive laboratory of Cochin's Hospital (Paris, France) after giving informed consent. Only human oocytes that could not be used for the patient fertility purposes were given for research according to the French bioethics laws. Spermatozoa were collected from excess fresh sperm derived from IVF attempts and were used on the day of collection. The GERMETHEQUE Biobank site of PARIS-COCHIN (BB-0033-00081) provided oocytes and sperm samples. GERMETHEQUE obtained consent from each patient to use their samples (CPP 2.15.27). The GERMETHEQUE pilotage committee approved the design of this study under the number 20160407-01. The Biobank has a declaration DC-2014-2202 and an authorization AC-2015-2350. *In vitro*-matured and unfertilized metaphase II oocytes were used for IVF. Zona pellucida was removed chemically using acidic Tyrode's solution (pH 2.5, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and oocytes were washed several times in FertiCult medium (FertiPro, Beernem, Belgium) supplemented with 3 % bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich, A3311, Saint Quentin Fallavier, France) and kept at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere for recovery (2 hours). Zona-free oocytes were inseminated with ~4000 capacitated motile human sperm, in 20 µl FertiCult medium 3 % BSA, and maintained at 37°C under 5 % CO₂ in air, under FertiCult Mineral oil (FertiPro, Beernem, Belgium) overnight. When used, either the anti-ADAM20 antibody (Aobious, NCTP00392, Gloucester, USA) or a Rabbit IgG Isotype Control (Invitrogen, 02-6102 Waltham, MA, USA) were added in the 20 µL drop at a final concentration of 50 µg/ml. Oocytes were then washed and directly mounted between slide and cover slide in VECTASHIELD PLUS Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, H-2000, Newark, CA, USA) for observation under UV light (Zeiss Axioskop 20 microscope, Marly le Roi, France). Oocytes were considered fertilized when at least a fluorescent decondensed sperm head could be visualized within their cytoplasm.

4.3. Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± SEM of at least three independent experiments. For statistical analysis, t-Test or One-way ANOVA were performed using GraphPad Prism version 9.5.1 for Windows, (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Abbreviations

SPACA6: Sperm acrosome associated 6
SOF1: Sperm-oocyte fusion required 1
TMEM95: Transmembrane protein 95
FIMP: Fertilization Influencing Membrane Protein
DCST1 and DCST2: Dendrocyte expressed seven transmembrane protein domain-containing
KO: Knock-out
IVF: *In Vitro* Fertilization
FI: Fertilization Index
ICSI: Intracytoplasmic sperm injection
ADAM20: A Disintegrin And Metalloprotease 20

References

1. Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*. 14 janv 2000;287(5451):319-21.

2. Chalbi M, Barraud-Lange V, Ravaux B, Howan K, Rodriguez N, Soule P, et al. Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development*. 1 oct 2014;141(19):3732-9.
3. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*. avr 2014;508(7497):483-7.
4. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*. 10 mars 2005;434(7030):234-8.
5. Vondrakova J, Frolikova M, Ded L, Cerny J, Postlerova P, Palenikova V, et al. MAIA, Fc receptor-like 3, supersedes JUNO as IZUMO1 receptor during human fertilization. *Sci Adv*. 9 sept 2022;8(36):eabn0047.
6. Barbaux S, Ialy-Radio C, Chalbi M, Dybal E, Homps-Legrand M, Do Cruzeiro M, et al. Sperm SPACA6 protein is required for mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion. *Sci Rep*. 24 mars 2020;10(1):5335.
7. Noda T, Lu Y, Fujihara Y, Oura S, Koyano T, Kobayashi S, et al. Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 26 mai 2020;117(21):11493-502.
8. Lamas-Toranzo I, Hamze JG, Bianchi E, Fernández-Fuertes B, Pérez-Cerezales S, Laguna-Barraza R, et al. TMEM95 is a sperm membrane protein essential for mammalian fertilization. *eLife*. 2 juin 2020;9:e53913.
9. Tang S, Lu Y, Skinner WM, Sanyal M, Lishko PV, Ikawa M, et al. Human sperm TMEM95 binds eggs and facilitates membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 4 oct 2022;119(40):e2207805119.
10. Hernández-Falcó M, Sáez-Espinosa P, López-Botella A, Aizpurua J, Gómez-Torres MJ. The Role of Sperm Proteins IZUMO1 and TMEM95 in Mammalian Fertilization: A Systematic Review. *IJMS*. 1 avr 2022;23(7):3929.
11. Fujihara Y, Lu Y, Noda T, Oji A, Larasati T, Kojima-Kita K, et al. Spermatozoa lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) fail to fuse with oocytes in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 28 avr 2020;117(17):9393-400.
12. Inoue N, Hagihara Y, Wada I. Evolutionarily conserved sperm factors, DCST1 and DCST2, are required for gamete fusion. *eLife*. 19 avr 2021;10:e66313.
13. Noda T, Blaha A, Fujihara Y, Gert KR, Emori C, Deneke VE, et al. Sperm membrane proteins DCST1 and DCST2 are required for sperm-egg interaction in mice and fish. *Commun Biol*. 7 avr 2022;5(1):332.
14. Jean C, Haghghirad F, Zhu Y, Chalbi M, Ziyat A, Rubinstein E, et al. JUNO, the receptor of sperm IZUMO1, is expressed by the human oocyte and is essential for human fertilisation. *Human Reproduction*. 1 janv 2019;34(1):118-26.
15. Sha YW, Xu X, Ji ZY, Mei LB, Qiu PP, Ji H, et al. Sperm-egg fusion disorder in a Chinese male patient was associated with a rare *ADAM20* variant. *Oncotarget*. 5 janv 2018;9(2):2086-91.

16. Nishimura H, Kim E, Nakanishi T, Baba T. Possible Function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin Complex in the Appearance of ADAM3 on the Sperm Surface. *Journal of Biological Chemistry*. août 2004;279(33):34957-62.
17. Yagami-Hiromasa T, Sato T, Kurisaki T, Kamijo K, Nabeshima Y, Fujisawa-Sehara A. A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature*. 19 oct 1995;377(6550):652-6.
18. Aghababaei M, Hogg K, Perdu S, Robinson WP, Beristain AG. ADAM12-directed ectodomain shedding of E-cadherin potentiates trophoblast fusion. *Cell Death Differ*. déc 2015;22(12):1970-84.
19. Han C, Choi E, Park I, Lee B, Jin S, Kim DH, et al. Comprehensive Analysis of Reproductive ADAMs: Relationship of ADAM4 and ADAM6 with an ADAM Complex Required for Fertilization in Mice¹. *Biology of Reproduction*. 1 mai 2009;80(5):1001-8.

IV. Article N°5

The absence of ADAM20 leads to in vitro hypofertility in mouse

Manuscrit en préparation

Marie-Sophie Girault, Sophie Dupuis, Rémi Pierre, Ahmed Ziyat et Sandrine Barbaux

The absence of ADAM20 leads to in vitro hypofertility in mouse

Marie-Sophie Girault¹, Sophie Dupuis¹, Rémi Pierre¹, Ahmed Ziyat^{1,2,†}, Sandrine Barbaux^{1,*†}

¹ Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014 PARIS, France.

² Service d'Histologie, d'Embryologie, Biologie de la Reproduction, AP-HP, Hôpital Cochin, F-75014 PARIS, France

* Correspondence: sandrine.barbaux@inserm.fr.

† Contributed equally to this work

Abstract

A mutation of the *ADAM20* gene has been described in an infertile patient whose spermatozoa were observed accumulating in the perivitelline space of oocytes. To decipher the role of ADAM20 in the fertilization process, we produced a mouse model knock-out (KO) for the *Adam20* gene. *Adam20* KO males showed an in vivo fertility similar to their wild-type littermates and had normal sperm counts and morphology. They however presented a reduced fertility in in vitro fertilization assays. To explore the hypothesis that the *Adam25* and *Adam39* genes could compensate the lack of *Adam20* given their very high homology, we decided to produce a triple KO deleting these 3 neighbor genes simultaneously. The phenotype was identical to that of the single gene deletion. Therefore, ADAM20, ADAM25 and ADAM39 are not essential proteins for fertilization but they seem to participate modestly to the process.

1. Introduction

Fertilization is defined by the succession of several steps. First, spermatozoa migrate in the female genital tract. Then, they cross the two barriers that protect the oocyte: the cumulus cells and the zona pellucida. After this step, spermatozoon adheres to the oocyte and finally fuses with the oocyte. To date, nine proteins have been described as essential for the adhesion of gametes. Two of them are present on the oocyte membrane and the seven others are spermatogenic. JUNO on the oocyte and IZUMO1 on the sperm head form a ligand-receptor couple directly involved in the adhesion of gametes [1,2]. CD9, on the oocyte, plays a molecular organizer role [3,4]. Sperm acrosome associated 6 (SPACA6), a protein localized on the sperm head, appears as essential for fertilization [5]. Sperm-oocyte fusion required 1 (SOF1), Transmembrane protein 95 (TMEM95) and Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP), three spermatogenic proteins, have also been described to be essential for the adhesion process of the gametes [6–10]. More recently, Dendrocyte expressed seven transmembrane protein domain-containing 1 and 2 (DCST1 and DCST2) have been also reported as essential in the fertilization process [11,12]. All these proteins, are directly or indirectly involved in the adhesion step of the spermatozoa with the oocyte. But, to date, the gamete fusion process remains unknown. Indeed, the adhesion of gametes seems to be driven by a complex molecular organization, implying several proteins, both on the sperm head and on the oocyte. Moreover, the distance between oocyte and sperm membranes must be perfect to induce an efficient adhesion which leads to the start of the fusion step. There is still a lack of knowledge to describe and explain the mechanism of fertilization as a whole, with on the one hand, the potential existence of other adhesion proteins playing a role in the complex molecular organization, and on the other hand, the discovery of proteins directly involved in gamete fusion. Knock-out (KO) mice invalidated for each of the genes essential for gamete adhesion show a common phenotype : mice are infertile and sperm are observed to cross the zona pellucida and accumulate in the perivitelline space [1,2,5–7,10,11,13]. Despite the proof of involvement of these proteins also in human

fertilization, mainly by the use of inhibitory antibodies in human In Vitro Fertilization (IVF) [5], no case of infertile patient with a mutation in any of these genes has been described. However, this phenotype of sperm accumulation in the perivitelline space has been reported in an article published in 2018, for an infertile patient. For this patient, attempts at IVF were inconclusive. This failure was compensated by the achievement of an Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) and continued with a pregnancy without abnormality. A genome analysis of this patient highlighted a mutation of the A Disintegrin And Metalloprotease protein 20 (*ADAM20*) gene which causes the substitution of a highly conserved amino acid. In addition, an immunostaining of ADAM20 on the patient's sperm did not show any staining, while on a control sperm, ADAM20 showed a ring localization around the head of the spermatozoa (and a weak staining of the acrosome) [14]. This observation suggested that this mutation of *ADAM20*, though at the heterozygous state, could be responsible for a defect of heterodimerization, localization or addressing of ADAM20, resulting in a lack of function of ADAM20.

ADAM20 belongs to the ADAM family, a large and highly conserved protein family. These proteins share common structural characteristics including a metalloprotease domain and a disintegrin domain. ADAM20 has a specific testicular expression and transcriptomic analyses show an expression profile specific of spermatids. As a protein of the ADAM family, ADAM20 possesses in its structure a disintegrin pattern which could allow a role in adhesion. Moreover, in its sequence, ADAM20 also presents a putative fusogenic peptide that could allow a role in fusion. All these characteristics suggest that ADAM20 could play a role in adhesion and/or fusion of gametes.

In another work, we reported results of human zona-free IVF assays using an antibody targeting ADAM20. Interestingly, this antibody significantly reduced the fertilization index (FI) compared to controls. We therefore decided to generate mouse lines invalidated for the *Adam20* gene in order to describe its potentially role in the adhesion and/or fusion process of gametes. Despite *Adam20* KO males are fertile *in vivo*, their *in vitro* fertility is significantly reduced.

2. Results

2.1. An anti-ADAM20 Antibody Inhibits IVF

To evaluate the role of ADAM20 in fertilization, *in vitro* fertilization (IVF) assays were performed with Wild-type (WT) sperm and oocytes from B6CBAF1 mice, in the presence or absence of a specific antibody targeting ADAM20. In cumulus-intact IVF, the fertilization rate (FR: number of fertilized oocytes among the total) of WT oocytes was 60.9 ± 3.3 % ($n = 215$) and 58.7 ± 3.4 % ($n = 206$) with WT sperm without or in presence of a Rabbit IgG control antibody respectively. However, using WT sperm in the presence of an antibody directed against mouse ADAM20 protein, the FR was 41.8 ± 3.3 % ($n = 227$) ($p < 0.001$) (Figure 1a).

In zona-free IVF using WT oocytes with WT sperm, in presence or not of Rabbit IgG control or anti-ADAM20 antibodies, the fertilization index (FI: the average of fused sperms per oocyte) was 2.87 ± 0.14 ($n = 76$), 2.61 ± 0.15 ($n = 67$) and 1.44 ± 0.10 ($n = 81$) respectively ($p < 0.0001$) (Figure 1b). These results show that inhibition of ADAM20 reduces IVF rates, suggesting a role of ADAM20 in the fertilization process.

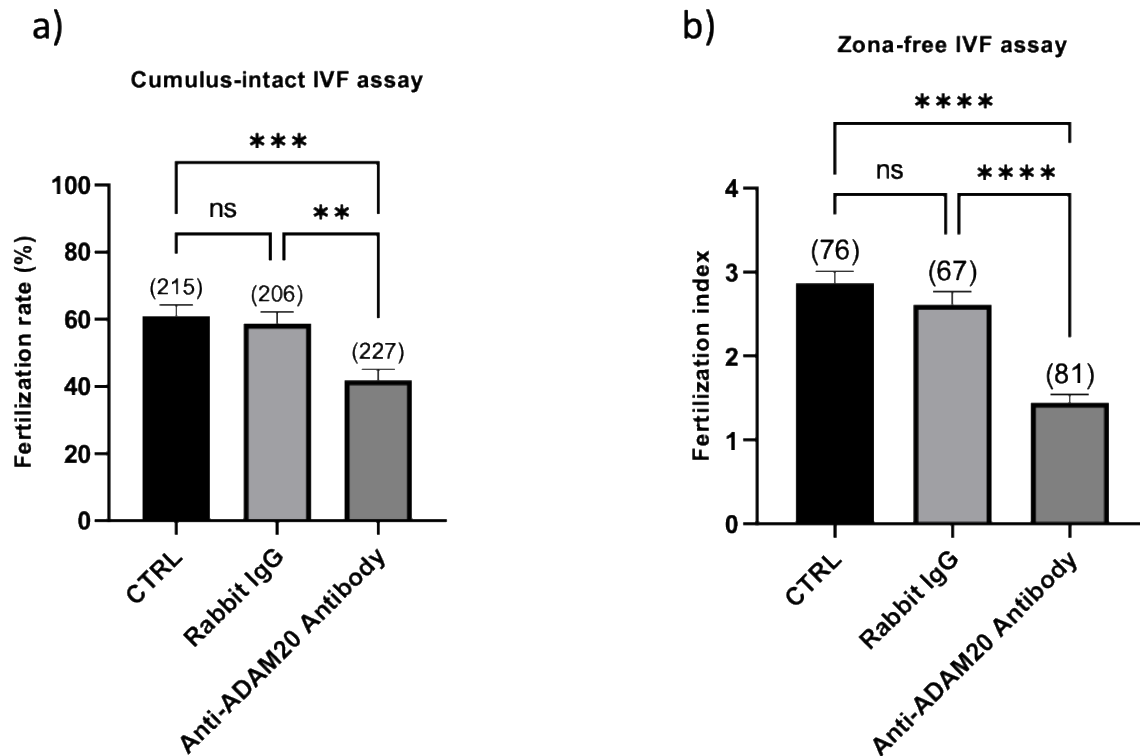


Figure 1. Evaluation of the anti-ADAM20 antibody on mouse male in vitro fertility. **(a)** Evaluation of in vitro fertility. The fertilization rate (or mean percentage \pm SEM of fertilized eggs) was assessed by cumulus-intact IVF assay at 10^6 sperm per ml in presence or not of Rabbit IgG control or anti-ADAM20 antibody. FR is reduced when anti-ADAM20 antibody is used. Numbers between brackets indicate the numbers of oocytes. **(b)** Evaluation of in vitro fertility. The fertilization index (or mean \pm SEM of sperm number fused by egg) was assessed by zona-free IVF assay at 10^5 sperm per ml in presence or not of Rabbit IgG control or anti-ADAM20 antibody. FI is reduced when anti-ADAM20 antibody is used. Numbers between brackets indicate the numbers of oocytes. Experiments were repeated at least three times. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

2.2. In Vivo Fertility Of Homozygous *Adam20* KO Males Is Not Affected

To study the role of ADAM20 during the adhesion and/or fusion of spermatozoa with the oocyte, mice invalidated for the *Adam20* gene were generated. Embryos were microinjected with RNA guides targeting upstream and at the end of exon 2 to generate a complete deletion of this exon (the only coding exon of *Adam20*) (Figure 2a). Two lines were obtained with a deletion of 338 nt or 377 nt respectively, corresponding to the expected loss of the total open reading frame.

To establish mouse lines and identify animals with a deletion of the exon, PCR amplification and sequencing of the region were performed (Figure 2b). To obtain homozygous KO mice, crossing of heterozygous animals were performed. After checking that both lines exhibited the same phenotype, the analyses were performed on one of them.

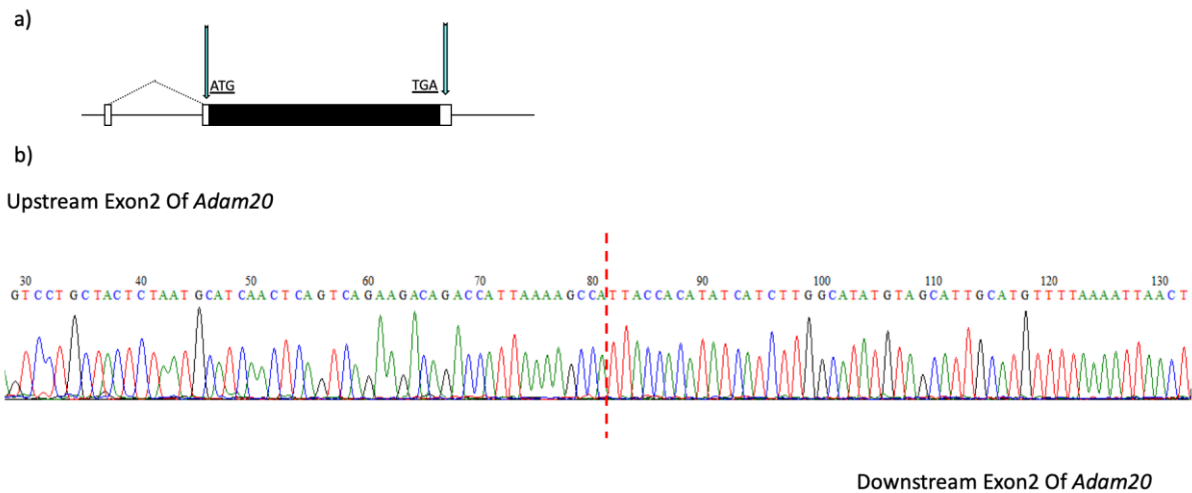


Figure 2. Deletion of the Adam20 gene. a) Map of the Adam20 gene and position of the RNA guides (blue arrows) and b) chromatogram of the deletion site including alignment with the WT sequence. The RNA guides are in blue and the PAM sites in yellow. Sequence of the founder mice of the Adam20 KO mouse line is shown in bold.

To evaluate their *in vivo* fertility, Adam20 KO males were mated with WT females. Normal sexual behavior was observed and pups were born of these matings. No significant difference was observed between litter sizes born from WT, 6.7 ± 0.58 pups per litter ($n = 10$), or from Adam20 KO males, 5.4 ± 0.71 pups per litter ($n = 12$) (Figure 3). This result suggests that the Adam20 gene is dispensable for the *in vivo* fertilization process.

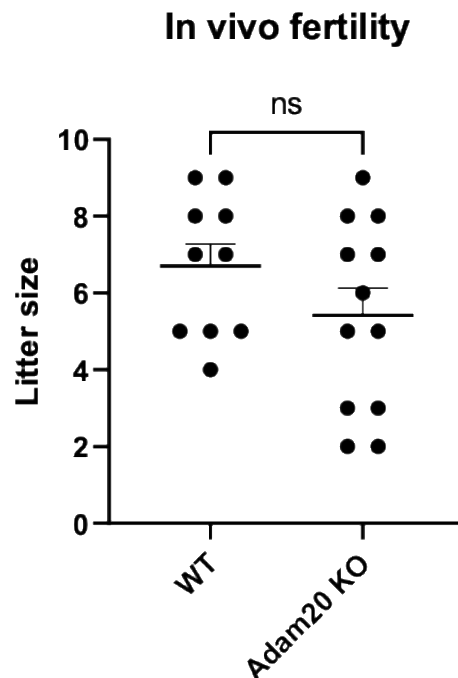


Figure 3. *In vivo* fertility assay. To determine the capacity of Adam20 KO males to fertilize *in vivo*, these males were mated with WT females. Vaginal plugs were checked after an overnight mating. At the end of gestation, the numbers of pups per litter were counted. Litters were generated from at least three different males of each group.

2.3. *In Vitro* Fertility Of Homozygous *Adam20* KO Males Is Reduced

Sperm counts and parameters observed using a CASA system were not different between WT and KO males. Testis histology did not show any abnormality (data not shown). IVF assays were performed using WT oocytes with WT sperm or *Adam20* KO sperm. In cumulus-intact IVF assays, the FR was $45.6 \pm 3\%$ ($n = 281$) with WT sperm and $17.0 \pm 2.3\%$ ($n = 265$) with *Adam20* KO sperm ($p < 0.0001$) (Figure 4a). In zona-free IVF assays, using WT sperm, a FI of 0.96 ± 0.05 sperm per oocyte ($n = 162$) was obtained whereas using *Adam20* KO sperm it was 0.65 ± 0.05 ($n = 161$) ($p < 0.0001$) (Figure 4b). *Adam20* KO males have a reduced *in vitro* fertility. Even if *in vivo* the absence of ADAM20 doesn't seem to have any effect on reproduction in controlled conditions, *in vitro* its absence affects and reduces both fertilization rate and index. According to this result, *Adam20* seems to play a minor role in fertilization even if this gene is not essential for this process.

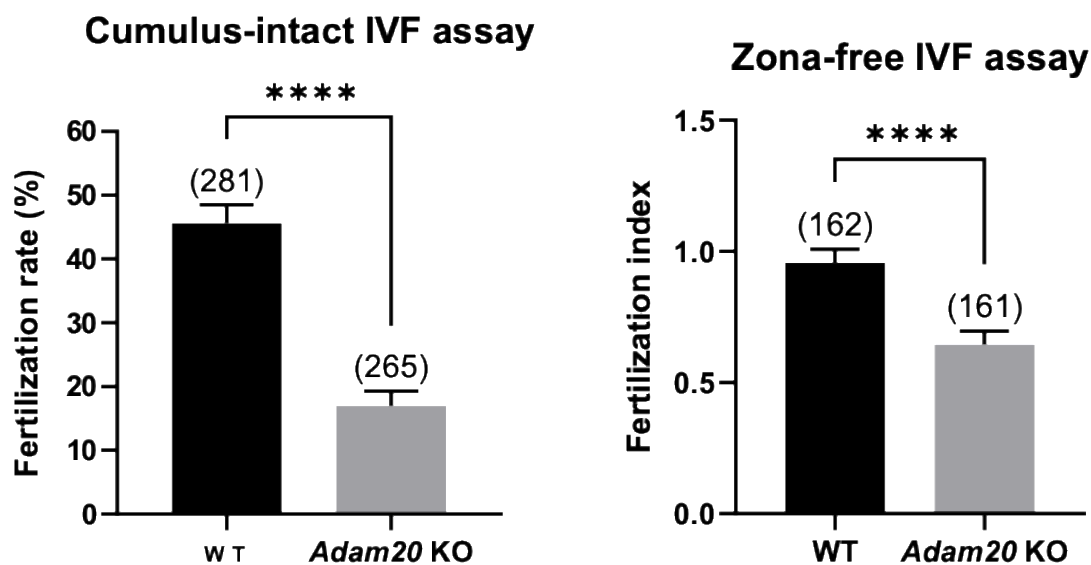


Figure 4. *In vitro* fertility assays. (a). Cumulus-intact IVF assay. The fertilization rate (or mean percentage \pm SEM of fertilized eggs) was assessed by cumulus-intact IVF assay at 10^6 (WT or KO) sperm per ml. FR is reduced when *Adam20* KO male's sperm is used. (b). Zona-free IVF assay. The fertilization index (or mean \pm SEM of sperm number fused by egg) was assessed by zona-free IVF assay at 10^5 (WT or KO) sperm per ml. FI is reduced when oocytes are inseminated by *Adam20* KO sperm compared to WT sperm.

Numbers between brackets indicate the numbers of oocytes. Experiments were repeated at least three times. **** $p < 0.0001$.

2.4. Multiplicity Of Mouse Adam Genes

In the present mouse model, *Adam20* is dispensable for *in vivo* fertility but its absence reduces *in vitro* fertility. Compensatory mechanisms because of genome redundancy in mouse models are well known and could mask the role of *Adam20* in fertilization. The analysis of genomic databases allowed us to notice that two other *Adam* genes are very similar to *Adam20*: *Adam25* and *Adam39*. The *Adam25* and *Adam39* genes have more than 90 % identity at the genomic level with *Adam20* and about 80 % at the protein level. These three *Adam* genes are present on mouse chromosome 8, localized side by side and likely the result of duplications: *Adam25* is placed just upstream *Adam20*, and *Adam39* right downstream of *Adam20*. However, in the

human genome, only *ADAM20* is expressed and functional. Indeed, *ADAM25* is a pseudogene and have been discontinued by NCBI, and *ADAM39* is missing from humans [15,16]. Based on the results of the fertility study of the *Adam20* KO mouse lines and the homologies between *Adam25*, *Adam20* and *Adam39*, we then decided to generate a simultaneous KO of these three genes. The high homology level between *Adam25*, *Adam20* and *Adam39*, together with their similar exclusively testicular pattern, could result in a redundancy of *Adam20*. In the *Adam20* KO mouse lines, the expression of *Adam25* and *Adam39* could compensate for the absence of *Adam20* and mask its role in the fertilization process.

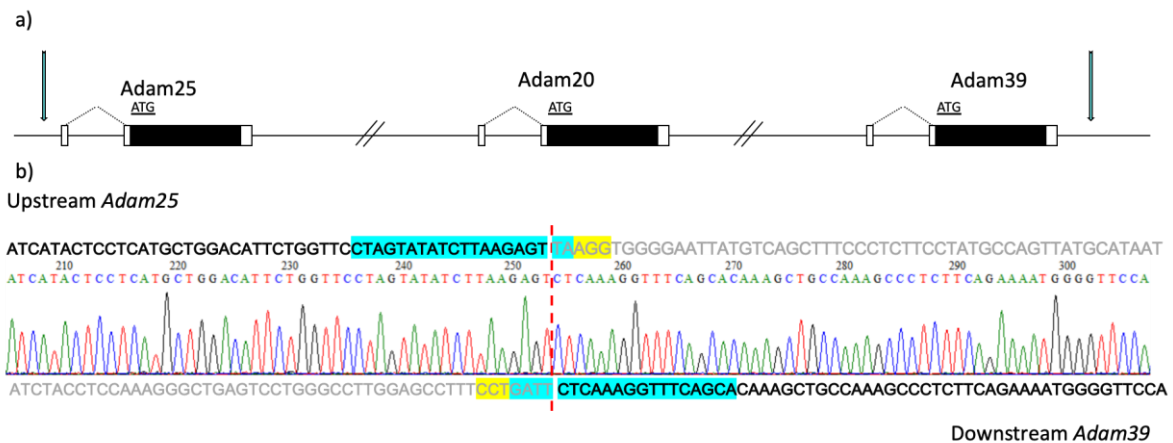


Figure 5. Deletion of the *Adam25-20-39* genes. a) Map of the *Adam25-20-39* region on chromosome 8. Blue arrows represent the RNA guides. b) Chromatogram of the deletion site including alignment with the WT sequence. The RNA guides are in blue and the PAM sites in yellow. Founder's sequence of the *Adam25-20-39* KO mouse line is shown in bold.

2.5. *In Vivo* Fertility Of Homozygous *Adam25-20-39* KO Males Is Not Affected

Adam25-20-39 KO mouse lines were generated to explore this hypothesis. CRISPR/Cas9 technology was used to delete a large genomic fragment including these three genes present on chromosome 8 one next to each other, and devoid of other known gene. Embryos were microinjected with RNA guides directed on loci localized on the one hand upstream *Adam25* and on the other hand downstream *Adam39*. This strategy induces a complete deletion of *Adam25*, *Adam20* and *Adam39* genes. Two mouse lines were generated with a deletion of 85 467 nt or 85 278 nt respectively. To identify animals invalidated for *Adam25-20-39*, PCR amplifications and sequencing have been made (Figure 5). Heterozygous animals were mated to maintain lines and to generate homozygous KO mice. After checking that both lines exhibited the same phenotype, the analyses were performed on one of them.

To assess their *in vivo* fertility, WT or KO males were mated with WT females. KO males exhibited a normal sexual behavior such as WT males. These matings were followed by birth of pups three weeks later. The number of pups per litter was counted and no significant difference was observed between WT or *Adam25-20-39* KO males' offspring. The average litter size of WT's offspring was 6.9 ± 0.68 pups whereas it was 8.0 ± 0.57 pups for KO's offspring (Figure 6). *Adam25-20-39* KO males have a normal fertility *in vivo*, suggesting that these three members of the ADAM family are dispensable for gamete adhesion and fusion in mouse.

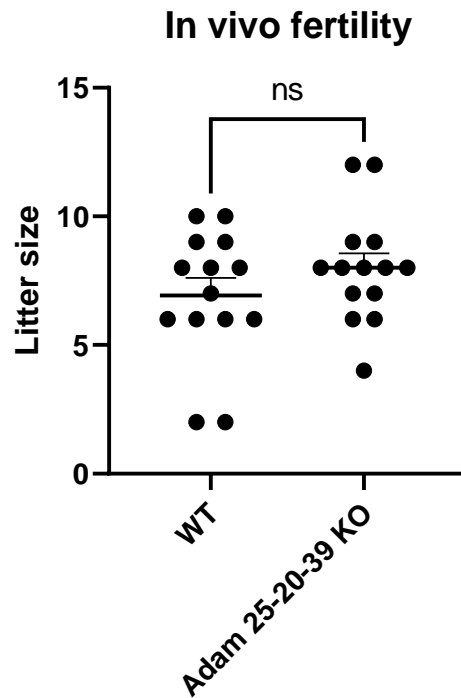


Figure 6. *In vivo* fertility assay. To determine the capacity of *Adam25-20-39* KO males to sire offspring, these males were mated with WT females. Vaginal plugs were checked after an overnight mating. At the end of gestation, the numbers of pups per litter were counted. Litters counted were generated from at least three different males of each group.

2.6. *In Vitro* Fertility Of Homozygous *Adam25-20-39* KO Males Is Reduced

Sperm counts and parameters observed using a CASA system were not different between WT and KO males. Testis histology did not show any abnormality (data not shown). To assess the *in vitro* fertility of homozygous *Adam25-20-39* KO males, IVF were performed using WT or *Adam25-20-39* KO sperm and WT oocytes. Cumulus-intact IVF showed that *Adam25-20-39* KO males' *in vitro* fertility is significantly reduced compared to WT group. The FR of the KO group was 30.5 ± 2.7 % (n = 298) whereas it was 53.8 ± 2.7 % (n = 305) for the WT group ($p < 0.0001$) (Figure 7a). Similar results were observed when Zona-free IVF was performed. With WT sperm, the FI was 1.28 ± 0.05 sperm per oocyte (n = 170) whereas with KO sperm it was 0.92 ± 0.05 (n = 181) ($p < 0.0001$) (Figure 7b). The analysis of the *in vitro* fertility of *Adam25-20-39* KO males showed the same results as previously described with the phenotyping of the *Adam20* KO line. *Adam25-20-39* KO males showed a fertility very similar to the simple KO of *Adam20*. The only lack of *Adam20* is sufficient to affect *in vitro* fertility and the additional absence of two very similar genes didn't worsen it.

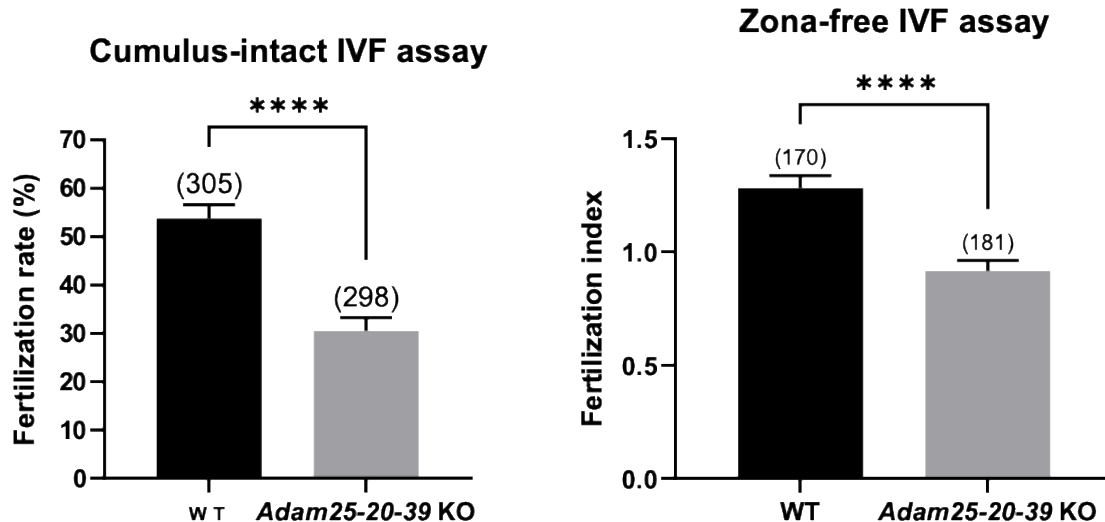


Figure 7. *In vitro* fertility assays. (a). Cumulus-intact IVF assay. The fertilization rate (or mean percentage \pm SEM of fertilized eggs) was assessed by cumulus-intact IVF assay at 10^6 (WT or KO) sperm per ml. FR is reduced when Adam25-20-39 KO male's sperm is used. (b). Zona-free IVF assay. The fertilization index (or mean \pm SEM of sperm number fused by egg) was assessed by zona-free IVF assay at 10^5 (WT or KO) sperm per ml. FI is reduced when oocytes are inseminated by Adam25-20-39 KO sperm compared to WT sperm. Numbers between brackets indicate the numbers of oocytes. Experiments were repeated at least three times. **** $p < 0.0001$.

3. Discussion

The description of a patient presenting with a fertilization defect and a mutation of the *ADAM20* gene drew attention on this member of the large ADAM family. Before the generation of *Adam20* KO mouse lines, we performed IVF in presence or absence of anti-ADAM20 antibodies. Both cumulus-intact and zona-free IVF showed a decrease of FR and FI when antibodies were present. However, we had noticed that this decrease seemed more severe in zona-free IVF than in cumulus-intact IVF. This could be explained by the experience itself, in zona-free IVF spermatozoa are directly put in contact with oocytes whereas in cumulus-intact IVF, cumulus cells and zona pellucida are present all around the oocytes. This difference could be explained by an aspecific binding of the antibody to the cells of the cumulus or to the zona pellucida making the antibody less available and therefore less effective on the spermatozoa. Indeed, cumulus cells are a kind of agglomerate of cells glued together by a gel containing hyaluronic acid.

To go further and to assess the role of *Adam20* in the adhesion and/or fusion of gametes, we generated KO mouse lines. Fertility of KO males was studied and it appeared that *Adam20* KO males have a normal fertility *in vivo*. However, a small but non-significant difference appeared, it is not excluded that this could become statistically significant with a large number of litters or by following this line over a long period. Especially since *in vitro*, using the sperm of *Adam20* KO, their fertilizing capacities were clearly reduced compared to WT.

Normal fertility *in vivo* points out this gene is dispensable for gamete adhesion and fusion in mouse. Under optimal conditions, such as those of *in vivo* fertilization, *Adam20*'s role is not visible. But, *Adam20* KO males are sub-fertile *in vitro*, suggesting that *Adam20* may play a role in the adhesion/ fusion of gametes because in artificial conditions, such as IVF, a little defect

can be increased and appears significantly different. Another explanation could be that the mutation of *Adam20*, in the case of the infertile patient, could be more damaging than its absence. For example, if ADAM20 belongs to a protein complex, its mutation could destabilize this complex making it ineffective, but its absence might be substitute with another protein (of the same protein family because of their highly conserved domains) making the complex efficient for its role in the fertilization's process.

Based on the results of the fertility study of *Adam20* KO line and high homologies between *Adam20*, *Adam25* and *Adam39*, we generated a KO of these three genes. Same experimental protocols were performed to generate those mouse lines and to assess their fertility. We observed the same phenotype shared by these two KO, simple or triple KO, homozygous males show a normal fertility *in vivo* but a subfertility *in vitro*. This result means *Adam25*, *Adam20* and *Adam39* are dispensable for gamete adhesion and fusion in mouse, but they participate to this process.

We also assessed *in vitro* fertility of WT, simple and triple KO males in presence of the antibody targeting ADAM20 (data not shown). We still observed a decrease of FR and FI in conditions with the antibody compared to conditions of those same males without the antibody. We could explain the effect of this antibody on those two KO lines by several hypotheses such as an antibody not as specific as we thought, or it might interact on others members of ADAM protein family. Indeed, protein family of ADAM is a large family which members share same domains and structure. If the antibody targets one of these similar domains, it is possible that it could target another ADAM family members, and specially ADAM known to play a role in the fertilization process such as ADAM1a-1b, ADAM2, ADAM3[17]. In this study, KO lines were much more informative than the use of antibody.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

All animal experiments were performed in agreement with national guidelines for the care and use of laboratory animals. Experimentation was approved by the local ethics committee (C2EA-34, Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale, Université Paris Cité) and the governmental ethical review committees via the APAFiS Application (Autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques), under the registration reference APAFIS #14124-2017072510448522 v26, A. Ziyat (10/10/2018-10/10/2023). Mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). All animals were maintained at the animal facility of the Cochin Institute (Paris) at a stable temperature (21–23°C) and 14 h light/10 h dark photoperiods, with free access to food and water.

4.2. Generation of Transgenic Mice

The Crispr/Cas9 approaches were performed at the MOUSET'IC core facility of the Cochin Institute, Paris, France. RNA guides were selected, produced by TACGENE (Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, France) and IDT (Leuven, Belgium), and tested *in vitro* (*Adam20* KO : targeting upstream exon 2 : CCAGCACTGCATGCAGACAACAC ; targeting at the end of exon 2 : CCTTCATGCATTACCACATATCA ; *Adam25-20-39* KO : targeting upstream *Adam25* : CTAGTATATCTTAAGAGTTAAGG, GCTGTACTGATCTCACCCCC ; targeting downstream *Adam39* : TTGCAACTTCTGGATGACCC, CCACGTCATTGTCTAATGAG, GATTCTCAAAGGTTTCAGCA). They were preincubated with Cas9 and then microinjected into fertilized C57Bl/6J oocytes. Embryos that had passed to the 2-cell stage were transferred into the oviducts of pseudogestant females.

4.3. PCR

Genotyping was performed on DNA extracted from tail biopsies (NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel, Düren, Germany) using the GoTaq Flexi polymerase (Promega, Madison, WI, USA) under standard PCR conditions. Primers are listed in Table S1. The integrity of the areas targeted by the guides was tested to detect WT alleles. A large amplification encompassing the whole locus was also performed to detect deleted alleles.

4.4. *In Vivo* and *In Vitro* Fertility Assessment

Mice, aged from 8 to 12 weeks, were housed as one male and one female per cage. WT females were mated overnight with WT males or homozygous KO males and checked for vaginal plugs the next day. For each group, litter sizes were counted.

Wild-type 5–8 weeks-old female mice were superovulated with a 10 IU pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) injection, then 48 h later with a 10 IU human chorionic gonadotrophin (hCG) injection (Intervet, Beaucouzé, France). The next day, 14 h post-injection, animals were sacrificed by cervical dislocation. Cumuli oophori were retrieved by tearing the ampulla wall of the oviduct, placed in FertiCult medium (FertiPro, Beernem, Belgium) supplemented with 3 % bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich, A3311, Saint Quentin Fallavier, France), and maintained at 37°C under 5 % CO₂ in air, under FertiCult Mineral oil (FertiPro, Beernem, Belgium). For zona-free IVF assay, oocytes were released from the cumulus cells by 3–5 min incubation at 37°C with hyaluronidase (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in M2 medium (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), rinsed and kept in FertiCult medium, BSA 3 % at 37°C under a 5 % CO₂ atmosphere with mineral oil (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The zona pellucida was then dissolved with acidic Tyrode's (AT) solution (pH 2.5, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) under visual monitoring. Zona-free eggs were rapidly rinsed in a FertiCult medium, BSA 3 % and kept at 37°C under a 5 % CO₂ atmosphere for 2 to 3 h to recover. Mouse spermatozoa were obtained from the cauda epididymis of control or KO male mice aged 8 to 13-weeks. They were capacitated at 37°C under a 5 % CO₂ for 90 min in a 500 µL drop of FertiCult medium supplemented with 3 % BSA, under mineral oil. Cumulus-intact or zona-free oocytes were inseminated in a 100 µL drop of FertiCult medium, BSA 3 % with capacitated spermatozoa at a final concentration of 1 X 10⁶/mL or 1 X 10⁵/mL, respectively, for 3 h. When used, the anti-ADAM20 antibody (Aobious, NCTP00392, Gloucester, USA) or Rabbit IgG Isotype Control (Invitrogen, 02-6102 Waltham, MA, USA) were added in the 100 µL drop at final concentration of 50 µg/mL. Oocytes were then washed and directly mounted in Vectashield Plus Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, H-2000, Newark, CA, USA) for observation under UV light (Zeiss Axioskop 20 microscope, Marly le Roi, France). Oocytes were considered fertilized when a fluorescent decondensed sperm head could be visualized within their cytoplasm.

4.5. Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± SEM of at least three independent experiments. For statistical analysis, t-Test or One-way ANOVA were performed using GraphPad Prism version 9.5.1 for Windows, (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Abbreviations

SPACA6: Sperm acrosome associated 6
SOF1: Sperm-oocyte fusion required 1
TMEM95: Transmembrane protein 95
FIMP: Fertilization Influencing Membrane Protein
DCST1 and DCST2: Dendrocyte expressed seven transmembrane protein domain-containing
KO: Knock-out
IVF: In Vitro Fertilization
ADAM(20, 25, 39): A disintegrin and metalloprotease protein 20
ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection
FI: Fertilization Index
FR: Fertilization Rate
WT: Wild-type

References

1. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*. 10 mars 2005;434(7030):234-8.
2. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*. avr 2014;508(7497):483-7.
3. Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*. 14 janv 2000;287(5451):319-21.
4. Chalbi M, Barraud-Lange V, Ravaux B, Howan K, Rodriguez N, Soule P, et al. Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development*. 1 oct 2014;141(19):3732-9.
5. Barbaux S, Ialy-Radio C, Chalbi M, Dybal E, Homps-Legrand M, Do Cruzeiro M, et al. Sperm SPACA6 protein is required for mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion. *Sci Rep*. 24 mars 2020;10(1):5335.
6. Noda T, Lu Y, Fujihara Y, Oura S, Koyano T, Kobayashi S, et al. Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice. *Proc Natl Acad Sci*. 26 mai 2020;117(21):11493-502.
7. Lamas-Toranzo I, Hamze JG, Bianchi E, Fernández-Fuertes B, Pérez-Cerezales S, Laguna-Barraza R, et al. TMEM95 is a sperm membrane protein essential for mammalian fertilization. *eLife*. 2 juin 2020;9:e53913.
8. Tang S, Lu Y, Skinner WM, Sanyal M, Lishko PV, Ikawa M, et al. Human sperm TMEM95 binds eggs and facilitates membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci*. 4 oct 2022;119(40):e2207805119.
9. Hernández-Falcó M, Sáez-Espinosa P, López-Botella A, Aizpurua J, Gómez-Torres MJ. The Role of Sperm Proteins IZUMO1 and TMEM95 in Mammalian Fertilization: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 1 avr 2022;23(7):3929.

10. Fujihara Y, Lu Y, Noda T, Oji A, Larasati T, Kojima-Kita K, et al. Spermatozoa lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) fail to fuse with oocytes in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 28 avr 2020;117(17):9393-400.
11. Inoue N, Hagihara Y, Wada I. Evolutionarily conserved sperm factors, DCST1 and DCST2, are required for gamete fusion. *eLife.* 19 avr 2021;10:e66313.
12. Noda T, Blaha A, Fujihara Y, Gert KR, Emori C, Deneke VE, et al. Sperm membrane proteins DCST1 and DCST2 are required for sperm-egg interaction in mice and fish. *Commun Biol.* 7 avr 2022;5(1):332.
13. Lorenzetti D, Poirier C, Zhao M, Overbeek PA, Harrison W, Bishop CE. A transgenic insertion on mouse chromosome 17 inactivates a novel immunoglobulin superfamily gene potentially involved in sperm-egg fusion. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* avr 2014;25(3-4):141-8.
14. Sha YW, Xu X, Ji ZY, Mei LB, Qiu PP, Ji H, et al. Sperm-egg fusion disorder in a Chinese male patient was associated with a rare *ADAM20* variant. *Oncotarget.* 5 janv 2018;9(2):2086-91.
15. Edwards D, Handsley M, Pennington C. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* oct 2008;29(5):258-89.
16. Choi I, Oh J, Cho BN, Ahnn J, Jung YK, Han Kim D, et al. Characterization and comparative genomic analysis of intronless Adams with testicular gene expression. *Genomics.* avr 2004;83(4):636-46.
17. Nishimura H, Kim E, Nakanishi T, Baba T. Possible Function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin Complex in the Appearance of ADAM3 on the Sperm Surface. *J Biol Chem.* août 2004;279(33):34957-62.

V. Discussion

Un article publié en 2018 a présenté le cas d'un patient infertile, qui décrit pour la première fois chez l'humain un phénotype particulier de spermatozoïdes s'accumulant dans l'espace périvitellin sans parvenir à fusionner avec l'ovocyte (Sha et al. 2018). Ce phénotype avait été jusqu'alors uniquement décrit pour les modèles de souris KO des protéines essentielles à l'interaction gamétique. Parmi les variants rares identifiés par analyse de son exome, le patient présentait une mutation du gène *ADAM20*. Ce gène, dont l'expression est spécifique du testicule, possède des domaines qui peuvent lui permettre de participer à des fonctions d'adhésion et/ou de fusion cellulaire. Nous nous sommes alors intéressés à décrire la fonction de ce gène jusqu'alors non élucidé.

Nous avons pu observer qu'*ADAM20* semble important pour la fécondation humaine puisque la réalisation de FIV humaine sur ovocytes dépellucidés montre une diminution significative de l'index de fécondation en présence d'anticorps anti-*ADAM20* par rapport aux contrôles. De la même façon, nous avons réalisé l'étude du gène *Adam20* chez la souris, ainsi que celle des gènes *Adam25* et *Adam39* qui sont des gènes homologues d'*Adam20*. Les résultats de ces études semblent nous indiquer qu'*Adam20* n'est pas indispensable à l'interaction gamétique mais qu'il jouerait néanmoins un rôle dans la fécondation.

Les mâles simple KO *Adam20* et les triples KO *Adam25-20-39* sont tous fertiles *in vivo* mais hypofertiles *in vitro*. Il semblerait donc qu'*ADAM20* joue un rôle plus important chez l'humain que chez la souris. Ceci pourrait s'expliquer par l'importance de la redondance dans le génome souris. En effet, il est décrit dans la littérature la multiplicité des gènes *Adam* dans le génome souris et la grande homologie qu'il peut exister entre certains d'entre eux. Ceci permettrait d'avoir plusieurs voies de gènes possibles pour assurer l'ensemble des processus physiologiques dans lesquels les *Adam* sont impliqués (Y. Chen et al. 2021). Ainsi, de nombreux gènes *Adam* existant chez la souris ont peu ou pas d'orthologues chez l'humain, et lorsqu'il en existe, ceux-ci peuvent s'avérer être des pseudogènes dans le génome humain (I. Choi et al. 2004; Y. Chen et al. 2021). C'est par exemple le cas pour le gène *Adam25* qui s'exprime dans le génome murin mais qui est un pseudogène dans le génome humain (Edwards, Handsley, et Pennington 2008). Dans le génome humain, *ADAM20* est seul, *ADAM25* est un pseudogène et *ADAM39* n'est pas référencé.

Concernant le marquage d'*ADAM20* dans l'article du cas du patient présentant la mutation d'*ADAM20*, les auteurs indiquent une localisation en forme de cercle, il s'agit d'un marquage de la région post-acrosomale. De plus, les auteurs n'ont pas précisé, ni pour le patient, ni pour le témoin, s'il s'agit de spermatozoïdes acrosome intact ou acrosome réagi. Or, notamment dans le cadre de protéines impliquées dans l'interaction gamétique, la localisation des protéines change suivant le statut acrosomal. Néanmoins, n'étant pas parvenus à valider l'anticorps que nous avons utilisé pour notre marquage

immunofluorescent, nous ne pouvons pas infirmer ni confirmer la localisation d'ADAM20 décrite dans l'article décrivant le cas du patient présentant la mutation d'ADAM20.

Lors des FIV humaines réalisées, nous n'avons pas pu reproduire le phénotype du patient qui présentait des spermatozoïdes s'accumulant dans l'espace périvitellin car les FIV humaines que nous réalisons en recherche se font sur ovocytes dépellucidés. Concernant l'anticorps utilisé pour les FIV humaines que nous avons effectuées, il a un effet d'inhibition de la fécondation. Cependant, en plus de n'être pas parvenus à formellement démontrer sa spécificité, nous ne savons pas si cet anticorps bloque ou gêne les propriétés d'adhésion et/ou de fusion d'ADAM20, s'il déstabilise ou empêche ADAM20 d'intégrer le complexe protéique auquel il appartient ou enfin s'il affecte voire inhibe son activité métalloprotéase.

Au départ, nous avons émis l'hypothèse qu'ADAM20 était un bon candidat pour jouer un rôle dans l'interaction gamétique du fait de ses capacités d'adhésion et/ou de fusion via ses domaines désintégrine et enrichi en cystéine. Or, il pourrait également s'agir de son activité métalloprotéase qui jouerait alors un rôle dans l'étape d'interaction gamétique en clivant l'ectodomaine d'une autre protéine présente sur la membrane plasmique spermatique ou ovocytaire (activité sheddase). Cependant, pour discriminer entre ces différentes activités de la protéine ADAM20, il faudrait disposer d'inhibiteurs de métalloprotéases spécifiques d'ADAM20. En effet, il existe des inhibiteurs de métalloprotéases non spécifiques, mais ces derniers ne sont pas utilisables dans le cadre de notre étude d'ADAM20 puisqu'il existe d'autres ADAMs présentes et dont le rôle dans la fécondation a pu être décrit (ADAM1, ADAM2, ADAM3 par exemple) (Shamsadin et al. 1999; Nishimura et al. 2001; 2004).

Nous avons choisi d'étudier le rôle d'ADAM20 dans l'interaction gamétique chez la souris en générant des modèles simple KO *Adam20* ou triple KO *Adam25-20-39*. Or, ces modèles KO sont imparfaits puisqu'ils ne permettent pas de reproduire exactement le cas du patient infertile. En effet, le patient ne présente pas une absence totale d'expression d'ADAM20, mais une mutation ponctuelle à l'état hétérozygote. La mutation d'un gène pourrait avoir des conséquences plus importantes que les délétions réalisées dans les modèles KO. Par exemple, une mutation peut engendrer l'expression d'une protéine présentant un changement de conformation par rapport à la protéine native et ainsi en altérer ses interactions ou ses fonctions. De la même façon, si la mutation se situe au niveau d'un site actif, cela peut modifier son activité. Il a été décrit que les protéines de la famille ADAM peuvent former des complexes protéiques, notamment des hétérodimères tels que ADAM1-ADAM2, ADAM2-ADAM3-ADAM4, ADAM2-ADAM3-ADAM5 ou encore ADAM2-ADAM3-ADAM6 (Cho et al. 2000; Han et al. 2009; T. Kim et al. 2006; Y. Chen et al. 2021). Ainsi, si ADAM20 est une protéine membre d'un complexe protéique, il est possible que dans le cas de la mutation présente chez le patient, le complexe protéique soit déstabilisé et la conséquence pourrait être plus sévère que la délétion du gène chez la souris, qui elle peut être compensée par un autre gène du fait de la redondance.

Dans le cadre de l'étude du patient infertile, la mutation décrite se situe dans le prodomaine, il s'agit d'un changement D214A qui est évalué par différents logiciels de prédiction d'effet comme soit neutre soit dommageable. Or, ce domaine est connu pour être important pour la dimérisation des protéines ADAM, mais également pour le mécanisme cystéine-switch qui permet de maintenir la partie enzymatique latente. Enfin, ce domaine est également important pour le repliement de la protéine et son transport intra-cellulaire (Loechel et al. 1999; Roghani et al. 1999; Leonard, Lin, et Milla 2005). La mutation d'*ADAM20* décrite chez ce patient a donc pu avoir des conséquences sur diverses activités de la protéine.

Malgré notre demande, nous n'avons pas pu avoir accès au résultat de l'exome du patient. Nous pouvons donc nous demander si la mutation d'*ADAM20* est bien la seule qui pourrait expliquer l'infertilité du patient ou si d'autres gènes présentaient des mutations. C'est pourquoi nous aurions souhaité pouvoir ré-analyser l'exome de ce patient. Dans le cadre de l'article, les auteurs ont recherché les variants rares et ont obtenu une liste de résultats de laquelle ils ont décidé d'étudier *ADAM20* du fait notamment de son expression testiculaire. Il aurait été intéressant d'avoir accès à cette liste complète de variants et de rechercher si certains d'entre eux pourraient être impliqués dans l'apparition de ce phénotype chez ce patient. Par ailleurs, la ré-analyse complète de l'exome avec une autre méthode, un autre filtre de critères ainsi que l'évolution des bases de données de ces dernières années pourrait apporter un nouveau regard sur l'origine potentielle de l'infertilité du patient.

L'évolution des bases de données et de l'étiquetage des génomes peut aussi préciser si le gène *Adam20* souris est bien l'orthologue du gène *ADAM20* humain, ou s'il existe un autre gène *Adam* qui présente plus d'homologie. En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que la génération des lignées KO que nous avons réalisées ne permet pas de reproduire le phénotype observé chez le patient puisqu'il pourrait ne pas s'agir de l'orthologue strict d'*ADAM20*. Un article de 2021 décrit qu'*ADAM20* est présent dans le même groupe avec 6 autres orthologues chez la souris formant ainsi le groupe suivant : *Adam21, 29, 26, 34, 24, 20* et *25* (Y. Chen et al. 2021). *Adam39* n'est pas présent dans cette liste, car pour le moment, il n'apparaît dans aucun article. Nous avons donc ici décrit les gènes *Adam20, Adam25* et *Adam39*. Le KO *Adam21* a été réalisé et les mâles de cette lignée n'ont aucune altération de la fertilité (Y. Chen et al. 2021). *Adam24* a quant à lui déjà été étudié et il jouerait un rôle dans le blocage à la polyspermie (Zhu et al. 1999; Zhu, Myles, et Primakoff 2001; Zhu et al. 2009). D'après la littérature, *Adam29* serait impliqué dans les processus cancéreux (Tziortzioti 2016; H. Chen et Wang 2018). Enfin, les gènes *Adam26* et *Adam34* ne sont pas étudiés dans la littérature. Il pourrait donc être intéressant d'étudier la fonction des gènes *Adam26* et *Adam34* dans la fécondation ou reproduction au sens large.

Pour conclure, il serait donc intéressant de poursuivre notre étude en tentant d'élucider quelle activité ou domaine de la protéine *ADAM20* joue un rôle dans la fécondation même si ce rôle n'est pas indispensable. La connaissance de ses partenaires après immunoprécipitation puis spectrométrie de masse permettrait de comprendre à quelles fonctions du spermatozoïde *ADAM20* participe. Nous pourrions également poursuivre en

étudiant les gènes *Adam26* et *Adam34* qui appartiennent au même groupe phylogénétique que les gènes *Adam21*, *29*, *24*, *20* et *25*. Enfin, lors de l'interaction gamétique et plus précisément immédiatement après la fusion des gamètes, on observe un relargage de la protéine JUNO ovocytaire qui jouerait un rôle dans le blocage à la polyspermie en venant se fixer sur les récepteurs spermatiques essentiels à la fusion gamétique, les empêchant ainsi de venir fusionner avec la membrane ovocytaire. Or, la génération du KO *Adam24* a permis de décrire un rôle d'*Adam24* dans le blocage à la polyspermie. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude d'*Adam24* et de tenter de définir comment il intervient dans le blocage à la polyspermie. Notamment, on peut se demander si son activité métalloprotéase pourrait participer à cliver l'ectodomaine de JUNO, permettant alors sa libération dans l'espace périvitellin, et ainsi neutraliser les spermatozoïdes qui y sont présents pour empêcher la survenue d'une polyspermie.

Conclusion générale

Mon projet de thèse s'est intéressé à l'étude de gènes candidats suspectés d'être impliqués dans deux étapes différentes de la reproduction. D'une part, j'ai étudié l'implication des gènes *Spata3* et *Tex44* dans la spermatogenèse. D'autre part, j'ai mené l'étude du rôle d'*Adam20*, ainsi que celle de ces homologues *Adam25* et *Adam39*, au cours de l'interaction gamétique.

Dans la partie de ma thèse s'intéressant à la spermatogenèse, nous avons tout d'abord étudié des lignées murines IRCS, présentant 98 % de leur génome d'espèce de référence et 2 % de leur génome d'espèce *Spretus*. Il s'agit d'un modèle original, de longue haleine. Cette démarche partait sans à priori et a permis de définir des régions d'intérêt au sein desquelles des gènes candidats doivent ensuite être explorés. La lignée qui nous a intéressés présentait un phénotype de globozoospermie partielle et nous a permis de définir un intervalle du génome, que nous avons appelé *Mafq1*, qui contiendrait un (ou des) gène(s) impliqués dans la globozoospermie. Nous avons alors choisi d'étudier les gènes *Spata3* et *Tex44*. D'après notre étude, *Spata3* serait un gène impliqué dans la mise en place de l'acrosome et devait participer au phénotype de la lignée RC3. Cependant, *Tex44* s'est finalement révélé être impliqué dans la mise en place du flagelle et probablement pas dans le phénotype du RC3. Aucune littérature n'existait sur ces gènes et aucune étude n'avait suspecté leur implication dans la reproduction. Ainsi, l'étude des lignées IRCS a permis de rechercher et de mettre en évidence le rôle de deux gènes intervenant au cours de la spermatogenèse, et plus particulièrement au cours de la spermiogenèse, l'un lors de la mise en place de l'acrosome et l'autre lors de la mise en place du flagelle. L'approche des IRCS a été intéressante pour mettre en évidence le rôle de plusieurs gènes dans différents processus physiologiques (hématologie, reproduction, développement, ...). Cependant, de nos jours, avec la possibilité de réaliser facilement des KO et à terme, l'existence de KO pour tous les gènes connus, l'établissement de lignées IRCS n'est plus utilisé. Néanmoins, la génération de KO vise généralement à déléter un gène entier, il peut être envisagé de mimer un phénotype observé en reproduisant plutôt une mutation.

Dans la partie de ma thèse s'intéressant au rôle d'*Adam20* au cours de l'interaction gamétique, nous avons pu déterminer qu'*Adam20* jouerait un rôle dans cette étape mais qu'il n'était pas essentiel. Nous suspicions ce gène d'être impliqué dans l'étape d'adhésion et/ou de fusion gamétique après qu'il ait été rapporté le cas d'un patient infertile présentant une mutation de ce gène. Le phénotype observé chez ce patient décrivait l'accumulation de spermatozoïdes dans l'espace périvitellin. Ce défaut d'adhésion et de fusion gamétique, ainsi que la structure d'ADAM20 avec son domaine disintégrine et son peptide fusogène putatif pouvait laisser penser qu'il pourrait être un acteur clef de l'interaction gamétique et peut-être même la protéine responsable de la fusion des gamètes, jusqu'alors non identifiée. Malgré

ces arguments solides, notre hypothèse s'est avérée ne pas être la bonne, ADAM20 n'est pas une protéine essentielle de l'interaction gamétique. Cependant, même si in vivo les souris mâles n'ont pas présenté de défaut de fertilité, les résultats des tests de fertilité in vitro ont suggéré qu'ADAM20 jouait un rôle dans la fécondation mais n'était pas indispensable. En effet, in vivo, les conditions sont dites optimales et masquent les altérations légères, alors qu'in vitro, le moindre petit défaut va se retrouver exacerber et visible. De plus, le modèle souris dans les études de fertilité est certes un bon modèle mais qui présente des limites. Tout d'abord, il est connu que dans le génome de la souris un très grand nombre de gènes homologues/paralogues entre eux existent et qu'un phénomène de redondance est possible, masquant ainsi l'effet du KO réalisé. De plus, il existe des différences entre l'espèce humaine et murine qui font que les études menées chez la souris ne permettent pas forcément de retrouver l'équivalent chez l'Homme. Par exemple, le KO *Adam1a* chez la souris a été réalisé et les mâles de cette lignée étaient infertiles suggérant un rôle essentiel d'ADAM1a dans la reproduction. Cependant, cela n'a pas pu être transposé à l'humain puisque chez ce dernier, *ADAM1A*, est un pseudogène. C'est d'ailleurs le cas de plusieurs membres de la famille des ADAMs qui sont exprimés chez la souris mais sont des pseudogènes chez l'humain. Enfin, concernant *ADAM20/Adam20*, il est également possible que son rôle dans la reproduction chez la souris soit moins important que chez l'humain car la reproduction chez la souris est plus efficace. En effet, une souris femelle ovule plusieurs ovocytes par cycle maximisant ainsi la chance que plusieurs d'entre eux soient fécondés, et elle a la capacité d'avoir des gestations comprenant jusqu'à plus de 10 futurs individus. A l'inverse, chez la femme un seul ovocyte est ovulé par cycle, et la femme ne porte le plus fréquemment qu'un seul enfant durant sa grossesse. Ainsi, chez la souris, même si une petite altération de la reproduction existe et qu'elle engendre un faible pourcentage d'ovocytes non fécondés, à la naissance de la portée, ce défaut peut ne pas être visible. De façon opposée, chez l'Homme, si un défaut de la reproduction, même minime, existe, alors le seul ovocyte présent ne sera pas fécondé.

De façon plus globale, mon projet de thèse a permis de décrire le rôle potentiel de trois gènes dans la reproduction : *Spata3* intervient dans la mise en place de l'acrosome, *Tex44* dans la mise en place du flagelle et enfin *Adam20* participe à l'interaction gamétique. Ainsi, ce projet a permis d'étudier et de proposer un rôle pour des gènes jusqu'alors non décrits. L'absence de description ou d'intérêt pour ces gènes auparavant induit une difficulté supplémentaire qui est celle d'un manque de connaissances et d'outils dédiés, comme des anticorps et de leur spécificité. Le manque d'anticorps fiable et dont la validité a déjà été prouvée a par exemple été un frein à certaines de nos études.

Bibliographie

- « Agence de la biomédecine ». 2021. 2021. <https://rams.agence-biomedecine.fr/media/4313>.
- Aghababaei, M, K Hogg, S Perdu, W P Robinson, et A G Beristain. 2015. « ADAM12-Directed Ectodomain Shedding of E-Cadherin Potentiates Trophoblast Fusion ». *Cell Death & Differentiation* 22 (12): 1970-84. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.44>.
- Akhmanova, Anna, Anne-Laure Mausset-Bonnefont, Wiggert van Cappellen, Nanda Keijzer, Casper C. Hoogenraad, Tatiana Stepanova, Ksenija Drabek, et al. 2005. « The Microtubule Plus-End-Tracking Protein CLIP-170 Associates with the Spermatid Manchette and Is Essential for Spermatogenesis ». *Genes & Development* 19 (20): 2501-15. <https://doi.org/10.1101/gad.344505>.
- Avidor-Reiss, Tomer, Matthew Mazur, Emily L. Fishman, et Puneet Sindhvani. 2019. « The Role of Sperm Centrioles in Human Reproduction – The Known and the Unknown ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2019.00188>.
- Baba, T, S Azuma, S Kashiwabara, et Y Toyoda. 1994. « Sperm from Mice Carrying a Targeted Mutation of the Acrosin Gene Can Penetrate the Oocyte Zona Pellucida and Effect Fertilization. » *Journal of Biological Chemistry* 269 (50): 31845-49. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31772-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31772-1).
- Bailey, Janice L. 2010. « Factors Regulating Sperm Capacitation ». *Systems Biology in Reproductive Medicine* 56 (5): 334-48. <https://doi.org/10.3109/19396368.2010.512377>.
- Barboux, Sandrine, Côme Ialy-Radio, Myriam Chalbi, Elisa Dybal, Méline Homps-Legrand, Marcio Do Cruzeiro, Daniel Vaiman, Jean-Philippe Wolf, et Ahmed Ziyat. 2020. « Sperm SPACA6 Protein Is Required for Mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion ». *Scientific Reports* 10 (1): 5335. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62091-y>.
- Bedford, J. M. 2011. « Site of the Mammalian Sperm Physiological Acrosome Reaction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (12): 4703-4. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102296108>.
- Bellil, Hela, Farah Ghieh, Emeline Hermel, Béatrice Mandon-Pepin, et François Vialard. 2021. « Human Testis-Expressed (TEX) Genes: A Review Focused on Spermatogenesis and Male Fertility ». *Basic and Clinical Andrology* 31 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/s12610-021-00127-7>.
- Ben Khelifa, Mariem, Charles Coutton, Raoudha Zouari, Thomas Karaouzène, John Rendu, Marie Bidart, Sandra Yassine, et al. 2014. « Mutations in DNAH1, which Encodes an Inner Arm Heavy Chain Dynein, Lead to Male Infertility from Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella ». *American Journal of Human Genetics* 94 (1): 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.11.017>.

- Berruti, Giovanna. 2016. « Towards Defining an 'Origin'—The Case for the Mammalian Acrosome ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 59 (novembre): 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.013>.
- Beurois, Julie, Caroline Cazin, Zine-Eddine Kherraf, Guillaume Martinez, Tristan Celse, Aminata Touré, Christophe Arnoult, Pierre F. Ray, et Charles Coutton. 2020. « Genetics of Teratozoospermia: Back to the Head ». *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 34 (6): 101473. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101473>.
- Bianchi, Enrica, Brendan Doe, David Goulding, et Gavin J. Wright. 2014. « Juno Is the Egg Izumo Receptor and Is Essential for Mammalian Fertilization ». *Nature* 508 (7497): 483-87. <https://doi.org/10.1038/nature13203>.
- Bianchi, Enrica, et Gavin J. Wright. 2023. « Mammalian Fertilization: Does Sperm IZUMO1 Mediate Fusion as Well as Adhesion? » *Journal of Cell Biology* 222 (2): e202301035. <https://doi.org/10.1083/jcb.202301035>.
- Bizkarguenaga, M., L. Gomez-Santos, J. F. Madrid, F. J. Sáez, et E. Alonso. 2019. « Increase of Germ Cell Nuclear Factor Expression in Globozoospermic Gopc^{-/-} Knockout Mice ». *Andrology* 7 (3): 319-28. <https://doi.org/10.1111/andr.12594>.
- Boucheix, C., et E. Rubinstein. 2001. « Tetraspanins ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58 (9): 1189-1205. <https://doi.org/10.1007/PL00000933>.
- Brukman, Nicolas G., Kohdai P. Nakajima, Clari Valansi, Kateryna Flyak, Xiaohui Li, Tetsuya Higashiyama, et Benjamin Podbilewicz. 2022. « A novel function for the sperm adhesion protein IZUMO1 in cell-cell fusion ». *The Journal of Cell Biology* 222 (2): e202207147. <https://doi.org/10.1083/jcb.202207147>.
- Brukman, Nicolas G., Berna Uygur, Benjamin Podbilewicz, et Leonid V. Chernomordik. 2019. « How cells fuse ». *The Journal of Cell Biology* 218 (5): 1436-51. <https://doi.org/10.1083/jcb.201901017>.
- Buffone, Mariano G., James A. Foster, et George L. Gerton. 2008. « The Role of the Acrosomal Matrix in Fertilization ». *The International Journal of Developmental Biology* 52 (5-6): 511-22. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072532mb>.
- Buffone, Mariano G., Noritaka Hirohashi, et George L. Gerton. 2014. « Unresolved Questions Concerning Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis1 ». *Biology of Reproduction* 90 (5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.117911>.
- Buffone, Mariano G., Esmeralda Rodriguez-Miranda, Bayard T. Storey, et George L. Gerton. 2009. « Acrosomal Exocytosis of Mouse Sperm Progresses in a Consistent Direction in Response to Zona Pellucida ». *Journal of Cellular Physiology* 220 (3): 611-20. <https://doi.org/10.1002/jcp.21781>.

- Buffone, Mariano G., Tiangang Zhuang, Teri S. Ord, Ling Hui, Stuart B. Moss, et George L. Gerton. 2008. « Recombinant Mouse Sperm ZP3-binding Protein (ZP3R/sp56) Forms a High Order Oligomer That Binds Eggs and Inhibits Mouse Fertilization in Vitro* ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (18): 12438-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706421200>.
- Burgio, Gaëtan, Marek Szatanik, Jean-Louis Guénet, Maria-Rosa Arnau, Jean-Jacques Panthier, et Xavier Montagutelli. 2007. « Interspecific Recombinant Congenic Strains Between C57BL/6 and Mice of the *Mus Spretus* Species: A Powerful Tool to Dissect Genetic Control of Complex Traits ». *Genetics* 177 (4): 2321-33. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.078006>.
- Buschiazio, Antoine, Marina Yefimova, Nicolas Bourmeyster, Alain Fautrel, Agnès Burel, Anne-Sophie Neyroud, Céline Pimentel, Sylvie Jaillard, Bernard Jégou, et Célia Ravel. 2019. « Autophagie et spermatozoïde ». *médecine/sciences* 35 (11): 852-58. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019172>.
- Celse, Tristan, Caroline Cazin, Flore Mietton, Guillaume Martinez, Delphine Martinez, Nicolas Thierry-Mieg, Amandine Septier, et al. 2021. « Genetic Analyses of a Large Cohort of Infertile Patients with Globozoospermia, DPY19L2 Still the Main Actor, GGN Confirmed as a Guest Player ». *Human Genetics* 140 (1): 43-57. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02229-0>.
- Chalbi, Myriam, Virginie Barraud-Lange, Benjamin Ravaux, Kevin Howan, Nicolas Rodriguez, Pierre Soule, Arnaud Ndzoudi, et al. 2014. « Binding of Sperm Protein Izumo1 and Its Egg Receptor Juno Drives Cd9 Accumulation in the Intercellular Contact Area Prior to Fusion during Mammalian Fertilization ». *Development* 141 (19): 3732-39. <https://doi.org/10.1242/dev.111534>.
- Charrin, Stéphanie, Stéphanie Jouannet, Claude Boucheix, et Eric Rubinstein. 2014. « Tetraspanins at a Glance ». *Journal of Cell Science*, janvier, jcs.154906. <https://doi.org/10.1242/jcs.154906>.
- Charrin, Stéphanie, François le Naour, Olivier Silvie, Pierre-Emmanuel Milhiet, Claude Boucheix, et Eric Rubinstein. 2009. « Lateral Organization of Membrane Proteins: Tetraspanins Spin Their Web ». *Biochemical Journal* 420 (2): 133-54. <https://doi.org/10.1042/BJ20082422>.
- Charrin, Stéphanie, Serge Manié, Martine Billard, Leonie Ashman, Denis Gerlier, Claude Boucheix, et Eric Rubinstein. 2003. « Multiple Levels of Interactions within the Tetraspanin Web ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304 (1): 107-12. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00545-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00545-X).
- Chen, Hongbing, et Siping Wang. 2018. « Clinical Significance of ADAM29 Promoting the Invasion and Growth of Gastric Cancer Cells In vitro ». *Oncology Letters*, mai. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8838>.
- Chen, Yinghong, Chao Liu, Yongliang Shang, Liying Wang, Wei Li, et Guoping Li. 2021. « Adam21 Is Dispensable for Reproductive Processes in Mice ». *PeerJ* 9 (septembre): e12210. <https://doi.org/10.7717/peerj.12210>.

- Cho, Chunghee, Haiyan Ge, Daniel Branciforte, Paul Primakoff, et Diana G. Myles. 2000. « Analysis of Mouse Fertilin in Wild-Type and Fertilin B^{-/-} Sperm: Evidence for C-Terminal Modification, α/β Dimerization, and Lack of Essential Role of Fertilin α in Sperm-Egg Fusion ». *Developmental Biology* 222 (2): 289-95. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9703>.
- Choi, Heejin, Cecil Han, Sora Jin, Jun Tae Kwon, Jihye Kim, Juri Jeong, Jaehwan Kim, et al. 2015. « Reduced Fertility and Altered Epididymal and Sperm Integrity in Mice Lacking ADAM71 ». *Biology of Reproduction* 93 (3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.130252>.
- Choi, Inchul, Jungsu Oh, Byung-Nam Cho, Joohong Ahnn, Yong-Keun Jung, Do Han Kim, et Chunghee Cho. 2004. « Characterization and Comparative Genomic Analysis of Intronless Adams with Testicular Gene Expression ». *Genomics* 83 (4): 636-46. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.10.001>.
- Coutton, C., J. Escoffier, G. Martinez, C. Arnoult, et P. F. Ray. 2015. « Teratozoospermia: Spotlight on the Main Genetic Actors in the Human ». *Human Reproduction Update* 21 (4): 455-85. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv020>.
- Crafa, Andrea, Rosita Angela Condorelli, Sandro La Vignera, Aldo Eugenio Calogero, et Rossella Cannarella. 2023. « Globozoospermia: A Case Report and Systematic Review of Literature ». *The World Journal of Men's Health* 41 (1): 49. <https://doi.org/10.5534/wjmh.220020>.
- Dacheux, Denis, Guillaume Martinez, Christine E Broster Reix, Julie Beurois, Patrick Lores, Magamba Tounkara, Jean-William Dupuy, et al. 2023. « Novel Axonemal Protein ZMYND12 Interacts with TTC29 and DNAH1, and Is Required for Male Fertility and Flagellum Function ». *eLife* 12 (novembre): RP87698. <https://doi.org/10.7554/eLife.87698>.
- Deneke, Victoria E., Andreas Blaha, Yonggang Lu, Jonne M. Draper, Clara S. Phan, Karin Panser, Alexander Schleiffer, et al. 2023. « A Conserved Fertilization Complex of Izumo1, Spaca6, and Tmem81 Mediates Sperm-Egg Interaction in Vertebrates ». Preprint. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.07.27.550750>.
- Deneke, Victoria E., et Andrea Pauli. 2021. « The Fertilization Enigma: How Sperm and Egg Fuse ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 37 (1): 391-414. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120219-021751>.
- Edwards, D, M Handsley, et C Pennington. 2008. « The ADAM Metalloproteinases ». *Molecular Aspects of Medicine* 29 (5): 258-89. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.001>.
- Escalier, Denise, et Aminata Touré. 2012. « Malformations de l'appareil flagellaire du spermatozoïde impliquées dans l'infertilité chez l'homme ». *médecine/sciences* 28 (5): 503-11. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012285015>.
- Fujihara, Yoshitaka, Yonggang Lu, Taichi Noda, Asami Oji, Tamara Larasati, Kanako Kojima-Kita, Zhifeng Yu, Ryan M. Matzuk, Martin M. Matzuk, et Masahito Ikawa. 2020. « Spermatozoa Lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) Fail to Fuse with Oocytes in Mice ».

- Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (17): 9393-9400.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1917060117>.
- Giebeler, Nives, et Paola Zigrino. 2016. « A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions ». *Toxins* 8 (4): 122. <https://doi.org/10.3390/toxins8040122>.
- Hall, Emma A., Margaret Keighren, Matthew J. Ford, Tracey Davey, Andrew P. Jarman, Lee B. Smith, Ian J. Jackson, et Pleasantine Mill. 2013. « Acute Versus Chronic Loss of Mammalian Azi1/Cep131 Results in Distinct Ciliary Phenotypes ». Édité par Susan K. Dutcher. *PLoS Genetics* 9 (12): e1003928. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003928>.
- Han, Cecil, Eunyoung Choi, Inju Park, Boyeon Lee, Sora Jin, Do Han Kim, Hitoshi Nishimura, et Chunghee Cho. 2009. « Comprehensive Analysis of Reproductive ADAMs: Relationship of ADAM4 and ADAM6 with an ADAM Complex Required for Fertilization in Mice¹ ». *Biology of Reproduction* 80 (5): 1001-8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073700>.
- Han, Cecil, Jun Tae Kwon, Inju Park, Boyeon Lee, Sora Jin, Heejin Choi, et Chunghee Cho. 2010. « Impaired Sperm Aggregation in Adam2 and Adam3 Null Mice ». *Fertility and Sterility* 93 (8): 2754-56. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.03.013>.
- Hirohashi, Noritaka, et Ryuzo Yanagimachi. 2018. « Sperm Acrosome Reaction: Its Site and Role in Fertilization† ». *Biology of Reproduction* 99 (1): 127-33. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y045>.
- Huijsduijnen, Rob Hooft van. 1998. « ADAM 20 and 21; Two Novel Human Testis-Specific Membrane Metalloproteases with Similarity to Fertilin-a ».
- Huovila, Ari Pekka J, Eduardo AC Almeida, et Judith M White. 1996. « ADAMs and cell fusion ». *Current Opinion in Cell Biology* 8 (5): 692-99. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(96\)80111-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(96)80111-6).
- Hwang, Jae Yeon, Shoaib Nawaz, Jungmin Choi, Huafeng Wang, Shabir Hussain, Mehboob Nawaz, Francesc Lopez-Giraldez, et al. 2021. « Genetic Defects in DNAH2 Underlie Male Infertility With Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella in Humans and Mice ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (avril): 662903. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.662903>.
- Inaba, K. 2011. « Sperm Flagella: Comparative and Phylogenetic Perspectives of Protein Components ». *Molecular Human Reproduction* 17 (8): 524-38. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar034>.
- Inoue, Naokazu, Yoshihisa Hagihara, et Ikuo Wada. 2021. « Evolutionarily Conserved Sperm Factors, DCST1 and DCST2, Are Required for Gamete Fusion ». *eLife* 10 (avril): e66313. <https://doi.org/10.7554/eLife.66313>.
- Inoue, Naokazu, Yoshihisa Hagihara, Danelle Wright, Takahisa Suzuki, et Ikuo Wada. 2015. « Oocyte-Triggered Dimerization of Sperm IZUMO1 Promotes Sperm–Egg Fusion in Mice ». *Nature Communications* 6 (1): 8858. <https://doi.org/10.1038/ncomms9858>.

- Inoue, Naokazu, Masahito Ikawa, Ayako Isotani, et Masaru Okabe. 2005. « The Immunoglobulin Superfamily Protein Izumo Is Required for Sperm to Fuse with Eggs ». *Nature* 434 (7030): 234-38. <https://doi.org/10.1038/nature03362>.
- Inoue, Naokazu, Takako Saito, et Ikuo Wada. 2020. « Unveiling a Novel Function of CD9 in Surface Compartmentalization of Oocytes ». *Development*, janvier, dev.189985. <https://doi.org/10.1242/dev.189985>.
- Ito, Chizuru, Fumie Suzuki-Toyota, Mamiko Maekawa, Yoshiro Toyama, Ryoji Yao, Tetsuo Noda, et Kiyotaka Toshimori. 2004. « Failure to Assemble the Peri-Nuclear Structures in GOPC Deficient Spermatids as Found in Round-Headed Spermatozoa ». *Archives of Histology and Cytology* 67 (4): 349-60. <https://doi.org/10.1679/aohc.67.349>.
- Jean, C, F Haghighirad, Y Zhu, M Chalbi, A Ziyat, E Rubinstein, C Gourier, et al. 2019. « JUNO, the Receptor of Sperm IZUMO1, Is Expressed by the Human Oocyte and Is Essential for Human Fertilisation ». *Human Reproduction* 34 (1): 118-26. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey340>.
- Jégou, Antoine, Ahmed Ziyat, Virginie Barraud-Lange, Eric Perez, Jean Philippe Wolf, Frédéric Pincet, et Christine Gourier. 2011. « CD9 Tetraspanin Generates Fusion Competent Sites on the Egg Membrane for Mammalian Fertilization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (27): 10946-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017400108>.
- Jeong, Jaemin, et Irina M. Conboy. 2011. « Phosphatidylserine Directly and Positively Regulates Fusion of Myoblasts into Myotubes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414 (1): 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.128>.
- Jreijiri, Fadwa, Emma Cavarocchi, Amir Amiri-Yekta, Caroline Cazin, Seyedeh-Hanieh Hosseini, Elma El Khouri, Catherine Patrat, et al. 2023. « CCDC65, Encoding a Component of the Axonemal Nexin-Dynein Regulatory Complex, Is Required for Sperm Flagellum Structure in Humans ». *Clinical Genetics* n/a (n/a). <https://doi.org/10.1111/cge.14459>.
- Kaji, Keisuke, Shoji Oda, Tomohide Shikano, Tatsuya Ohnuki, Yoshikatsu Uematsu, Junko Sakagami, Norihiro Tada, Shunichi Miyazaki, et Akira Kudo. 2000. « The Gamete Fusion Process Is Defective in Eggs of Cd9-Deficient Mice ». *Nature Genetics* 24 (3): 279-82. <https://doi.org/10.1038/73502>.
- Kang, Q., Y. Cao, et A. Zolkiewska. 2000. « Metalloprotease-Disintegrin ADAM 12 Binds to the SH3 Domain of Src and Activates Src Tyrosine Kinase in C2C12 Cells ». *The Biochemical Journal* 352 Pt 3 (Pt 3): 883-92.
- Khawar, Muhammad Babar, Hui Gao, et Wei Li. 2019. « Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00195>.
- Kierszenbaum, Abraham L., Eugene Rivkin, Laura L. Tres, Bradley K. Yoder, Courtney J. Haycraft, Michel Bornens, et Rosa M. Rios. 2011. « GMAP210 and IFT88 Are Present in the Spermatid Golgi Apparatus and Participate in the Development of the Acrosome–Acroplaxome Complex,

- Head–Tail Coupling Apparatus and Tail ». *Developmental Dynamics* 240 (3): 723-36. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22563>.
- Kierszenbaum, Abraham L., et Laura L. Tres. 2004. « The Acrosome-Acroplaxome-Manchette Complex and the Shaping of the Spermatid Head ». *Archives of Histology and Cytology* 67 (4): 271-84. <https://doi.org/10.1679/aohc.67.271>.
- Kim, Ekyune, Daichi Baba, Masanori Kimura, Misuzu Yamashita, Shin-ichi Kashiwabara, et Tadashi Baba. 2005. « Identification of a Hyaluronidase, Hyal5, Involved in Penetration of Mouse Sperm through Cumulus Mass ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (50): 18028-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506825102>.
- Kim, Ekyune, Misuzu Yamashita, Masanori Kimura, Arata Honda, Shin-ichi Kashiwabara, et Tadashi Baba. 2008. « Sperm Penetration through Cumulus Mass and Zona Pellucida ». *The International Journal of Developmental Biology* 52 (5-6): 677-82. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072528ek>.
- Kim, Kye-Seong, et George L. Gerton. 2003. « Differential Release of Soluble and Matrix Components: Evidence for Intermediate States of Secretion during Spontaneous Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm☆ ». *Developmental Biology* 264 (1): 141-52. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.08.006>.
- Kim, Taewan, Jungsu Oh, Jong-Min Woo, Eunyong Choi, Sin Hyeog Im, Yung Joon Yoo, Do Han Kim, Hitoshi Nishimura, et Chunghee Cho. 2006. « Expression and Relationship of Male Reproductive ADAMs in Mouse1 ». *Biology of Reproduction* 74 (4): 744-50. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.048892>.
- Klein, Theo, et Rainer Bischoff. 2011. « Active Metalloproteases of the A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) Family: Biological Function and Structure ». *Journal of Proteome Research* 10 (1): 17-33. <https://doi.org/10.1021/pr100556z>.
- Kurisaki, Tomohiro, Aki Masuda, Katsuko Sudo, Junko Sakagami, Shigeki Higashiyama, Yoichi Matsuda, Akira Nagabukuro, et al. 2003. « Phenotypic Analysis of Meltrin β (ADAM12)-Deficient Mice: Involvement of Meltrin β in Adipogenesis and Myogenesis ». *MOL. CELL. BIOL.* 23.
- Lamas-Toranzo, Ismael, Julieta G Hamze, Enrica Bianchi, Beatriz Fernández-Fuertes, Serafín Pérez-Cerezales, Ricardo Laguna-Barraza, Raúl Fernández-González, et al. 2020. « TMEM95 Is a Sperm Membrane Protein Essential for Mammalian Fertilization ». *eLife* 9 (juin): e53913. <https://doi.org/10.7554/eLife.53913>.
- Le Naour, F., E. Rubinstein, C. Jasmin, M. Prenant, et C. Boucheix. 2000. « Severely Reduced Female Fertility in CD9-Deficient Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 287 (5451): 319-21. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.319>.
- Le Naour, François, Stéphanie Charrin, Valérie Labas, Jean-Pierre Le Caer, Claude Boucheix, et Eric Rubinstein. 2004. « Tetraspanins Connect Several Types of Ig Proteins: IgM Is a Novel

- Component of the Tetraspanin Web on B-Lymphoid Cells ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 53 (3): 148-52. <https://doi.org/10.1007/s00262-003-0477-5>.
- Lee, Seonhee, Seong Hyeon Hong, et Chunghee Cho. 2020. « Normal Fertility in Male Mice Lacking ADAM32 with Testis-Specific Expression ». *Reproductive Biology* 20 (4): 589-94. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.09.001>.
- Lehti, M. S., et A. Sironen. 2016. « Formation and Function of the Manchette and Flagellum during Spermatogenesis ». *Reproduction* 151 (4): R43-54. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0310>.
- Lehti, Mari S., Noora Kotaja, et Anu Sironen. 2013. « KIF3A Is Essential for Sperm Tail Formation and Manchette Function ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 377 (1-2): 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.030>.
- Lehti, Mari S., Fu-Ping Zhang, Noora Kotaja, et Anu Sironen. 2017. « SPEF2 Functions in Microtubule-Mediated Transport in Elongating Spermatids to Ensure Proper Male Germ Cell Differentiation ». *Journal of Cell Science* 130 (15): e1.2-e1.2. <https://doi.org/10.1242/jcs.208710>.
- Leonard, Jennifer D., Frank Lin, et Marcos E. Milla. 2005. « Chaperone-like Properties of the Prodomain of TNF α -Converting Enzyme (TACE) and the Functional Role of Its Cysteine Switch ». *Biochemical Journal* 387 (3): 797-805. <https://doi.org/10.1042/BJ20041727>.
- Li, Wei, Waixing Tang, Maria E. Teves, Zhengang Zhang, Ling Zhang, Hongfei Li, Kellie J. Archer, et al. 2015. « A MEIG1/PACRG Complex in the Manchette Is Essential for Building the Sperm Flagella ». *Development* 142 (5): 921-30. <https://doi.org/10.1242/dev.119834>.
- Liu, Miao, Yanfei Ru, Yihua Gu, Jianan Tang, Tiancheng Zhang, Jun Wu, Fudong Yu, et al. 2018. « Disruption of Ssp411 Causes Impaired Sperm Head Formation and Male Sterility in Mice ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1862 (3): 660-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.12.005>.
- Loechel, Frosty, Michael T. Overgaard, Claus Oxvig, Reidar Albrechtsen, et Ulla M. Wewer. 1999. « Regulation of Human ADAM 12 Protease by the Prodomain ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (19): 13427-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13427>.
- Lorenzetti, Diego, Christophe Poirier, Ming Zhao, Paul A. Overbeek, Wilbur Harrison, et Colin E. Bishop. 2014. « A Transgenic Insertion on Mouse Chromosome 17 Inactivates a Novel Immunoglobulin Superfamily Gene Potentially Involved in Sperm-Egg Fusion ». *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 25 (3-4): 141-48. <https://doi.org/10.1007/s00335-013-9491-x>.
- Malcher, Agnieszka, Natalia Rozwadowska, Tomasz Stokowy, Tomasz Kolanowski, Piotr Jedrzejczak, Wojmir Zietkowiak, et Maciej Kurpisz. 2013. « Potential Biomarkers of Nonobstructive Azoospermia Identified in Microarray Gene Expression Analysis ». *Fertility and Sterility* 100 (6): 1686-1694.e7. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.1999>.

- Manfrevola, Francesco, Florian Guillou, Silvia Fasano, Riccardo Pierantoni, et Rosanna Chianese. 2021. « LINCKing the Nuclear Envelope to Sperm Architecture ». *Genes* 12 (5): 658. <https://doi.org/10.3390/genes12050658>.
- Mao, Hai-Tao, et Wan-Xi Yang. 2013. « Modes of Acrosin Functioning during Fertilization ». *Gene* 526 (2): 75-79. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.05.058>.
- Martinez, Guillaume, Anne-Laure Barbotin, Caroline Cazin, Zeina Wehbe, Angèle Boursier, Amir Amiri-Yekta, Abbas Daneshpour, et al. 2023. « New Mutations in DNHD1 Cause Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (3): 2559. <https://doi.org/10.3390/ijms24032559>.
- Martinez, Guillaume, Catherine Metzler-Guillemain, Caroline Cazin, Zine-Eddine Kherraf, Odile Paulmyer-Lacroix, Christophe Arnoult, Pierre F. Ray, et Charles Coutton. 2023. « Expanding the Sperm Phenotype Caused by Mutations in SPATA20: A Novel Splicing Mutation in an Infertile Patient with Partial Globozoospermia ». *Clinical Genetics* 103 (5): 612-14. <https://doi.org/10.1111/cge.14284>.
- Mendoza-Lujambio, I. 2002. « The Hook1 Gene Is Non-Functional in the Abnormal Spermatozoon Head Shape (Azh) Mutant Mouse ». *Human Molecular Genetics* 11 (14): 1647-58. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.14.1647>.
- Merveille, Anne-Christine, Erica E Davis, Anita Becker-Heck, Marie Legendre, Israel Amirav, Géraldine Bataille, John Belmont, et al. 2011. « CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs ». *Nature genetics* 43 (1): 72-78. <https://doi.org/10.1038/ng.726>.
- Miyado, K., E. Mekada, et K. Kobayashi. 2000. « [A crucial role of tetraspanin, CD9 in fertilization] ». *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme* 45 (10): 1728-34.
- Modarres, Parastoo, Marziyeh Tavalaei, et Kamran Ghaedi. 2019. « An Overview of The Globozoospermia as A Multigenic Identified Syndrome ». *International Journal of Fertility and Sterility* 12 (4). <https://doi.org/10.22074/ijfs.2019.5561>.
- Moreno, Ricardo D. 2023. « Human Globozoospermia-Related Genes and Their Role in Acrosome Biogenesis ». *WIREs Mechanisms of Disease* 15 (2): e1589. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1589>.
- Moreno, Ricardo D, et Carlos P Alvarado. 2006. « The Mammalian Acrosome as a Secretory Lysosome: New and Old Evidence ». *Molecular Reproduction and Development* 73 (11): 1430-34. <https://doi.org/10.1002/mrd.20581>.
- Morozumi, Kazuto, et Ryuzo Yanagimachi. 2005. « Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (40): 14209-14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507005102>.

- Nasr-Esfahani, Mohammad H., Shahnaz Razavi, Zeinab Javdan, et Marzeyeh Tavalae. 2008. « Artificial Oocyte Activation in Severe Teratozoospermia Undergoing Intracytoplasmic Sperm Injection ». *Fertility and Sterility* 90 (6): 2231-37. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.10.047>.
- Nishimura, Hitoshi, Chunghee Cho, Daniel R. Branciforte, Diana G. Myles, et Paul Primakoff. 2001. « Analysis of Loss of Adhesive Function in Sperm Lacking Cyritestin or Fertilin β ». *Developmental Biology* 233 (1): 204-13. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0166>.
- Nishimura, Hitoshi, Ekyune Kim, Tomoko Nakanishi, et Tadashi Baba. 2004. « Possible Function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin Complex in the Appearance of ADAM3 on the Sperm Surface ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (33): 34957-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314249200>.
- Noda, Taichi, Andreas Blaha, Yoshitaka Fujihara, Krista R. Gert, Chihiro Emori, Victoria E. Deneke, Seiya Oura, et al. 2022. « Sperm Membrane Proteins DCST1 and DCST2 Are Required for Sperm-Egg Interaction in Mice and Fish ». *Communications Biology* 5 (1): 332. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03289-w>.
- Noda, Taichi, Yonggang Lu, Yoshitaka Fujihara, Seiya Oura, Takayuki Koyano, Sumire Kobayashi, Martin M. Matzuk, et Masahito Ikawa. 2020. « Sperm Proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 Are Required for Sperm-oocyte Fusion in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (21): 11493-502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922650117>.
- Nozawa, Yoko Inès, Erica Yao, Rhodora Gacayan, Shan-Mei Xu, et Pao-Tien Chuang. 2014. « Mammalian Fused Is Essential for Sperm Head Shaping and Periaxonemal Structure Formation during Spermatogenesis ». *Developmental Biology* 388 (2): 170-80. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.02.002>.
- O'Donnell, Liza, et Moira K. O'Bryan. 2014. « Microtubules and spermatogenesis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology, Regulation of Spermatogenesis Part II & DNA Replication*, 30 (juin): 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.01.003>.
- O'Donnell, Liza, Danielle Rhodes, Stephanie J. Smith, D. Jo Merriner, Brett J. Clark, Claire Borg, Belinda Whittle, et al. 2012. « An Essential Role for Katanin P80 and Microtubule Severing in Male Gamete Production ». Édité par Wayne N. Frankel. *PLoS Genetics* 8 (5): e1002698. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002698>.
- Okabe, Masaru, Mitsuro Yagasaki, Hiroshi Oda, Sumio Matzno, Yasuhiro Kohama, et Tsutomu Mimura. 1988. « Effect of a Monoclonal Anti-Mouse Sperm Antibody (OBF13) on the Interaction of Mouse Sperm with Zona-Free Mouse and Hamster Eggs ». *Journal of Reproductive Immunology* 13 (3): 211-19. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(88\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0165-0378(88)90002-2).
- Omran, Heymut, Daisuke Kobayashi, Heike Olbrich, Tatsuya Tsukahara, Niki T. Loges, Haruo Hagiwara, Qi Zhang, et al. 2008. « Ktu/PF13 Is Required for Cytoplasmic Pre-Assembly of Axonemal Dyneins ». *Nature* 456 (7222): 611-16. <https://doi.org/10.1038/nature07471>.
- Otčenášková, Tereza, Eliška Macíčková, Jana Vondráková, Michaela Frolíková, Katerina Komrskova, Romana Stopková, et Pavel Stopka. 2023. « Proteomic Analysis of the Mouse Sperm Acrosome

- towards an Understanding of an Organelle with Diverse Functionality ». *European Journal of Cell Biology* 102 (2): 151296. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2023.151296>.
- Pasch, Elisabeth, Jana Link, Carolin Beck, Stefanie Scheuerle, et Manfred Alsheimer. 2015. « The LINC Complex Component Sun4 Plays a Crucial Role in Sperm Head Formation and Fertility ». *Biology Open* 4 (12): 1792-1802. <https://doi.org/10.1242/bio.015768>.
- Pereira, Rute, et Mário Sousa. 2023. « Morphological and Molecular Bases of Male Infertility: A Closer Look at Sperm Flagellum ». *Genes* 14 (2): 383. <https://doi.org/10.3390/genes14020383>.
- Pitnick, Scott, Mariana F. Wolfner, et Steve Dorus. 2020. « Post-ejaculatory modifications to sperm (PEMS) ». *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 95 (2): 365-92. <https://doi.org/10.1111/brv.12569>.
- Ray, P.f., A. Toure, C. Metzler-Guillemain, M.j. Mitchell, C. Arnoult, et C. Coutton. 2017. « Genetic Abnormalities Leading to Qualitative Defects of Sperm Morphology or Function ». *Clinical Genetics* 91 (2): 217-32. <https://doi.org/10.1111/cge.12905>.
- Reiss, Karina, et Paul Saftig. 2009. « The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) Family of Sheddases: Physiological and Cellular Functions ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (2): 126-37. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.11.002>.
- Reitinger, Stephan, Gerhard Thomas Laschober, Christine Fehrer, Brigitte Greiderer, et Günter Lepperdinger. 2007. « Mouse Testicular Hyaluronidase-like Proteins SPAM1 and HYAL5 but Not HYALP1 Degrade Hyaluronan ». *Biochemical Journal* 401 (1): 79-85. <https://doi.org/10.1042/BJ20060598>.
- Rival, Claudia M., Wenhao Xu, Laura S. Shankman, Sho Morioka, Sanja Arandjelovic, Chang Sup Lee, Karen M. Wheeler, et al. 2019. « Phosphatidylserine on viable sperm and phagocytic machinery in oocytes regulate mammalian fertilization ». *Nature Communications* 10 (octobre): 4456. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12406-z>.
- Roghani, Monireh, J. David Becherer, Marcia L. Moss, Ruth E. Atherton, Hediye Erdjument-Bromage, Joaquin Arribas, R. Kevin Blackburn, Gisela Weskamp, Paul Tempst, et Carl P. Blobel. 1999. « Metalloprotease-Disintegrin MDC9: Intracellular Maturation and Catalytic Activity ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (6): 3531-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3531>.
- Rubinstein, E, A Ziyat, J Wolf, F Lenaour, et C Boucheix. 2006. « The Molecular Players of Sperm–Egg Fusion in Mammals ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 17 (2): 254-63. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2006.02.012>.
- Rubinstein, Eric, François Le Naour, Cécile Lagaudrière-Gesbert, Martine Billard, Hélène Conjeaud, et Claude Boucheix. 1996. « CD9, CD63, CD81, and CD82 Are Components of a Surface Tetraspan Network Connected to HLA-DR and VLA Integrins ». *European Journal of Immunology* 26 (11): 2657-65. <https://doi.org/10.1002/eji.1830261117>.

- Runge, Kathryn E., James E. Evans, Zhi-Yong He, Surabhi Gupta, Kent L. McDonald, Henning Stahlberg, Paul Primakoff, et Diana G. Myles. 2007. « Oocyte CD9 Is Enriched on the Microvillar Membrane and Required for Normal Microvillar Shape and Distribution ». *Developmental Biology* 304 (1): 317-25. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.12.041>.
- Satouh, Yuhkoh, Naokazu Inoue, Masahito Ikawa, et Masaru Okabe. 2012. « Visualization of the Moment of Mouse Sperm–Egg Fusion and Dynamic Localization of IZUMO1 ». *Journal of Cell Science*, janvier, jcs.100867. <https://doi.org/10.1242/jcs.100867>.
- Sha, Yan-Wei, Xiaohui Xu, Zhi-Yong Ji, Li-Bin Mei, Ping-Ping Qiu, Hong Ji, Ping Li, Lin Li, et Wei-Wu Liu. 2018. « Sperm-Egg Fusion Disorder in a Chinese Male Patient Was Associated with a Rare ADAM20 Variant ». *Oncotarget* 9 (2): 2086-91. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23331>.
- Shamsadin, Rahman, Ibrahim M. Adham, Karim Nayernia, Uwe A.O. Heinlein, Heike Oberwinkler, et Wolfgang Engel. 1999. « Male Mice Deficient for Germ-Cell Cytostatin Are Infertile1 ». *Biology of Reproduction* 61 (6): 1445-51. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.6.1445>.
- Tanphaichitr, Nongnui, Euridice Carmona, Maroun Bou Khalil, Hongbin Xu, Trish Berger, et George L. Gerton. 2007. « New insights into sperm-zona pellucida interaction: involvement of sperm lipid rafts ». *Frontiers in Bioscience-Landmark* 12 (5): 1748-66. <https://doi.org/10.2741/2186>.
- Tavalaee, Marziyeh, Nushin Naderi, Navid Esfandiari, et Mohammad Hossein NasrEsfahani. 2023. « Assisted Oocyte Activation Following Intracytoplasmic Sperm Injection: A Sensible Option for Infertile Couples with Severe Teratozoospermia ». *International Journal of Fertility and Sterility* 17 (2). <https://doi.org/10.22074/ijfs.2023.1973580.1395>.
- Touré, Aminata, Guillaume Martinez, Zine-Eddine Kherraf, Caroline Cazin, Julie Beurois, Christophe Arnoult, Pierre F. Ray, et Charles Coutton. 2021. « The Genetic Architecture of Morphological Abnormalities of the Sperm Tail ». *Human Genetics* 140 (1): 21-42. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02113-x>.
- Tulsiani, Daulat R.P., Aida Abou-Haila, Christoph R. Loeser, et Ben M.J. Pereira. 1998. « The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization ». *Experimental Cell Research* 240 (2): 151-64. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.3943>.
- Tziortzioti, Roula. 2016. « ADAM29 Expression in Human Breast Cancer and Its Effects on Breast Cancer Cells In Vitro ». *ANTICANCER RESEARCH*.
- Umeda, Rie, Yuhkoh Satouh, Mizuki Takemoto, Yoshiko Nakada-Nakura, Kehong Liu, Takeshi Yokoyama, Mikako Shirouzu, et al. 2020. « Structural insights into tetraspanin CD9 function ». *Nature Communications* 11 (mars): 1606. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15459-7>.
- Verrier, S, A Hogan, N McKie, et M Horton. 2004. « ADAM Gene Expression and Regulation during Human Osteoclast Formation ». *Bone* 35 (1): 34-46. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.12.029>.

- Vondrakova, Jana, Michaela Frolikova, Lukas Ded, Jiri Cerny, Pavla Postlerova, Veronika Palenikova, Ondrej Simonik, et al. 2022. « MAIA, Fc Receptor–like 3, Supersedes JUNO as IZUMO1 Receptor during Human Fertilization ». *Science Advances* 8 (36): eabn0047. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn0047>.
- Wang, Huizhen, Xiaoman Hong, et William H Kinsey. 2021. « Sperm–Oocyte Signaling: The Role of IZUMO1R and CD9 in PTK2B Activation and Actin Remodeling at the Sperm Binding Site ». *Biology of Reproduction* 104 (6): 1292-1301. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab048>.
- Wang, Wei-Li, Chao-Feng Tu, et Yue-Qiu Tan. 2020. « Insight on Multiple Morphological Abnormalities of Sperm Flagella in Male Infertility: What Is New? » *Asian Journal of Andrology* 22 (3): 236. https://doi.org/10.4103/aja.aja_53_19.
- Wang, Xiang, Chuan Jiang, Siyu Dai, Gan Shen, Yihong Yang, et Ying Shen. 2023. « Identification of Nonfunctional SPATA20 Causing Acephalic Spermatozoa Syndrome in Humans ». *Clinical Genetics* 103 (3): 310-19. <https://doi.org/10.1111/cge.14268>.
- Wei, Ya-Lan, et Wan-Xi Yang. 2018. « The Acroframosome-Acroplaxome-Manchette Axis May Function in Sperm Head Shaping and Male Fertility ». *Gene* 660 (juin): 28-40. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.059>.
- Wolfsberg, T G, P Primakoff, D G Myles, et J M White. 1995. « ADAM, a Novel Family of Membrane Proteins Containing A Disintegrin And Metalloprotease Domain: Multipotential Functions in Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions. » *The Journal of Cell Biology* 131 (2): 275-78. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.2.275>.
- Xiong, Wenfeng, Chunling Shen, et Zhugang Wang. 2021. « The Molecular Mechanisms Underlying Acrosome Biogenesis Elucidated by Gene-Manipulated Mice† ». *Biology of Reproduction* 105 (4): 789-807. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab117>.
- Yagami-Hiromasa, T., T. Sato, T. Kurisaki, K. Kamijo, Y. Nabeshima, et A. Fujisawa-Sehara. 1995. « A Metalloprotease-Disintegrin Participating in Myoblast Fusion ». *Nature* 377 (6550): 652-56. <https://doi.org/10.1038/377652a0>.
- Yamaguchi, Ryo, Yuko Muro, Ayako Isotani, Keizo Tokuhiro, Kazuhiro Takumi, Ibrahim Adham, Masahito Ikawa, et Masaru Okabe. 2009. « Disruption of ADAM3 Impairs the Migration of Sperm into Oviduct in Mouse1 ». *Biology of Reproduction* 81 (1): 142-46. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074021>.
- Yassine, Sandra, Jessica Escoffier, Guillaume Martinez, Charles Coutton, Thomas Karaouzène, Raoudha Zouari, Jean-Luc Ravanat, et al. 2015. « Dpy19l2-Deficient Globozoospermic Sperm Display Altered Genome Packaging and DNA Damage That Compromises the Initiation of Embryo Development ». *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* 21 (2): 169-85. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau099>.

- Yi, Chongil, Jong-Min Woo, Cecil Han, Jeong Su Oh, Inju Park, Boyeon Lee, Sora Jin, et al. 2010. « Expression Analysis of the Adam21 Gene in Mouse Testis ». *Gene Expression Patterns* 10 (2-3): 152-58. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2010.01.003>.
- Yildiz, Yildiz, Heidrun Matern, Bonne Thompson, Jeremy C. Allegood, Rebekkah L. Warren, Denise M.O. Ramirez, Robert E. Hammer, F. Kent Hamra, Siegfried Matern, et David W. Russell. 2006. « Mutation of β -Glucosidase 2 Causes Glycolipid Storage Disease and Impaired Male Fertility ». *Journal of Clinical Investigation* 116 (11): 2985-94. <https://doi.org/10.1172/JCI29224>.
- Yogo, Keiichiro. 2022. « Molecular Basis of the Morphogenesis of Sperm Head and Tail in Mice ». *Reproductive Medicine and Biology* 21 (1): e12466. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12466>.
- Yu, Yi, Jiaxiong Wang, Liming Zhou, Haibo Li, Bo Zheng, et Shenmin Yang. 2021. « CFAP43-Mediated Intra-Manchette Transport Is Required for Sperm Head Shaping and Flagella Formation ». *Zygote (Cambridge, England)* 29 (1): 75-81. <https://doi.org/10.1017/S0967199420000556>.
- Zhang, Yang, Trieu Le, Ryan Grabau, Zahra Mohseni, Hoejeong Kim, David R. Natale, Liping Feng, Hua Pan, et Huanghe Yang. 2020. « TMEM16F phospholipid scramblase mediates trophoblast fusion and placental development ». *Science Advances* 6 (19): eaba0310. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba0310>.
- Zheng, Huili, Clifford J. Stratton, Kazuto Morozumi, Jingling Jin, Ryuzo Yanagimachi, et Wei Yan. 2007. « Lack of Spem1 Causes Aberrant Cytoplasm Removal, Sperm Deformation, and Male Infertility ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (16): 6852-57. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701669104>.
- Zhu, Guo-Zhang, Surabhi Gupta, Diana Gold Myles, et Paul Primakoff. 2009. « Testase 1 (ADAM 24) a sperm surface metalloprotease is required for normal fertility in mice ». *Molecular Reproduction and Development* 76 (11): 1106-14. <https://doi.org/10.1002/mrd.21076>.
- Zhu, Guo-Zhang, Ying Lin, Diana G Myles, et Paul Primakoff. 1999. « Identification of Four Novel ADAMs with Potential Roles in Spermatogenesis and Fertilization ». *Gene* 234 (2): 227-37. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00208-5).
- Zhu, Guo-Zhang, Diana G. Myles, et Paul Primakoff. 2001. « Testase 1 (ADAM 24) a Plasma Membrane-Anchored Sperm Protease Implicated in Sperm Function during Epididymal Maturation or Fertilization ». *Journal of Cell Science* 114 (9): 1787-94. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.9.1787>.
- Ziyyat, Ahmed, Eric Rubinstein, Frédérique Monier-Gavelle, Virginie Barraud, Olivier Kulski, Michel Prenant, Claude Boucheix, Morgane Bomsel, et Jean-Philippe Wolf. 2006. « CD9 Controls the Formation of Clusters That Contain Tetraspanins and the Integrin A6 β 1, Which Are Involved in Human and Mouse Gamete Fusion ». *Journal of Cell Science* 119 (3): 416-24. <https://doi.org/10.1242/jcs.02730>.

Etude de gènes candidats : ***Spata3* et *Tex44* dans la spermatogenèse et *Adam20* dans l'interaction gamétique**

La spermatogenèse est le processus biologique qui aboutit à la production de spermatozoïdes. Ceux-ci vont subir des étapes de maturation qui leur permettront de féconder l'ovocyte lors de l'interaction gamétique. Une anomalie lors de la spermatogenèse, de la maturation des spermatozoïdes ou de l'interaction gamétique peut mener à des défauts de fertilité. A ce jour, environ 15% des cas d'infertilité restent inexplicables. Il est donc essentiel de comprendre dans le détail les différents mécanismes de la spermatogenèse et de la fécondation.

L'objectif de ma thèse a été d'identifier des gènes pouvant jouer un rôle dans les étapes de la spermatogenèse et de l'interaction gamétique. J'ai tenté d'identifier des gènes impliqués dans la mise en place de l'acrosome (organite essentiel à la fécondation). En parallèle, je me suis intéressée à l'interaction gamétique, en caractérisant un gène potentiellement impliqué dans la fusion des gamètes.

Dans le premier volet de ma thèse, j'ai analysé des lignées hypofertiles de souris IRCS (Interspecific Recombinant Congenic Strain) qui présentaient un phénotype de globozoospermie partielle caractérisée par un détachement de l'acrosome. Nous avons pu définir un locus *Mafq1* pour Male fertility Quantitative Trait Locus chromosome 1, dans lequel l'expression de gènes de version *Mus spretus* dans un fond génétique *Mus musculus domesticus* induisait l'apparition de ce phénotype. Dans *Mafq1*, nous nous sommes intéressés au gène *Spermatogenesis Associated 3 (Spata3)* en générant une lignée de souris Knock-out (KO). Leur fertilité *in vivo* n'est pas affectée mais ils sont hypofertiles *in vitro*. Leurs spermatozoïdes présentent des défauts morphologiques (détachement partiel de l'acrosome) et métaboliques (persistance de résidus cytoplasmiques avec gouttelettes lipidiques). La lignée KO *Spata3* ne reproduit que partiellement le phénotype observé dans les lignées IRCS. Nous avons poursuivi en étudiant le gène *Tex44* présent dans *Mafq1*. Les mâles KO *Tex44* ont une fertilité diminuée *in vivo* et *in vitro*. Aucun défaut acrosomal n'a été observé mais une anomalie du flagelle a été identifiée : une disjonction entre la pièce principale et la pièce intermédiaire, ainsi que l'absence de certains doublets de microtubules de la pièce principale. Ces anomalies flagellaires affectent la mobilité des spermatozoïdes et expliquent l'hypofertilité observée.

Ainsi, en partant de l'analyse génomique d'une lignée IRCS présentant une globozoospermie partielle, nous avons identifié deux gènes impliqués dans la spermatogenèse, l'un participant à la mise en place de l'acrosome, et l'autre impliqué dans la formation du flagelle.

Parallèlement, j'ai mené une étude visant à caractériser la fonction d'*ADAM20*, que nous suspicions de jouer un rôle dans l'adhésion et/ou la fusion gamétique. En réalisant des fécondations *in vitro* (FIV) chez l'humain en présence d'anticorps dirigés contre *ADAM20*, nous avons observé une diminution significative de l'index de fécondation suggérant un rôle dans l'interaction gamétique. Nous avons généré la lignée KO *Adam20* dont les mâles montrent une fertilité normale *in vivo* mais une hypofertilité *in vitro*. Nous avons généré des souris délétées pour un fragment contenant les gènes *Adam25*, *20* et *39* car ces trois gènes voisins sont très homologues. Les mâles triple KO ont présenté le même phénotype de fertilité que celui des mâles KO *Adam20*. *ADAM20* chez l'humain, et *ADAM25*, *20* et *39* chez la souris semblent donc jouer un rôle dans l'interaction gamétique mais ne sont pas essentiels au déroulement de cette étape.

Dans l'ensemble, ma thèse s'est donc intéressée à des anomalies de la fertilité dont l'origine pouvait se situer à différentes étapes de la spermatogenèse et de la fécondation. Même si des avancées sont réalisées dans la connaissance du processus de la fécondation, il subsiste encore des inconnues à ce jour, et il est crucial de continuer la recherche dans ce domaine afin de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de ces processus fondamentaux.

Mots clefs : Fertilité, Interaction Gamétique, Knock-Out (KO), Globozoospermie, Acrosome, Flagelle, *Mafq1*, *Spata3*, *Tex44*, *Adam20*, *Adam25*, *Adam39*